

**Vanda Isabel da Silva Matos Serras Marques**

**Desnaturação de Alta Resolução Aplicada ao  
Diagnóstico Genético de Miocardiopatia  
Hipertrófica**

**Monte Caparica**

**2010**



**nº de arquivo**

**“Copyright”**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**Vanda Isabel da Silva Matos Serras Marques**

**Desnaturação de Alta Resolução Aplicada ao  
Diagnóstico Genético de Miocardiopatia  
Hipertrófica**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho  
Ramos Fernandes (FCT/UNL)

**Co-orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Doutora Susana Isabel Rodrigues dos Santos  
(ULHT)

**Monte Caparica**

**2010**

Parte do trabalho apresentado nesta dissertação encontra-se incluído no artigo

Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Silveira, L., Marques, V., Brito, D., Madeira, H., Bicho, M., Fernandes, A.F. 2010. *Genetic Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy using Mass Spectrometry DNA Arrays and High Resolution Melting*.

Este artigo encontra-se actualmente em publicação pela Revista da Sociedade Portuguesa de Cardiologia.

A versão aceite para publicação encontra-se em anexo a esta dissertação.

Ao meu Avô, pela importância que teve na minha vida.

## **Agradecimentos**

Neste caminho de aprendizagem constante iniciado por mim há precisamente um ano, desejo expressar os meus agradecimentos a todas as pessoas e entidades que comigo colaboraram e me prestaram ajuda neste estudo de investigação.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Professora Doutora Alexandra Fernandes e Professora Doutora Susana Santos, por me terem possibilitado as condições para a realização deste trabalho, pela confiança em mim depositada, boa disposição, encorajamento e disponibilidade em todas as horas.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e à Universidade Lusófona, pela oportunidade dada ao terem disponibilizado instalações e condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, nas pessoas da Professora Doutora Isabel Carreira e Doutora Ana Santos, pela colaboração no processo de sequenciação das amostras.

Aos meus colegas de laboratório, Leonor Silveira, Helena Oliveira, Kelly Veiga, Ana Silva, Luís Raposo e João Leite pelas constantes trocas de ideias, críticas e conselhos, por toda a entajuda, espírito de equipa e amizade, dentro e fora do laboratório.

Ao André, pelas suas questões pertinentes sobre o mundo da ciência, por todo o apoio e compreensão e sobretudo, por conseguir me fazer rir nas alturas mais difíceis.

Aos meus Tios, por todo o apoio, ânimo e conversas intelectuais, e sobretudo à minha Tia, pelas risadas contagiantes e por todos os telefonemas cheios de preocupações e conselhos.

À minha Mãe e à minha irmã Inês, pela constante paciência e compreensão em todas as horas, e por todo o carinho e apoio incondicionais.

À minha Avó, pelo orgulho e amizade constantes.



## Sumário

A Miocardiopatia Hipertrófica (MH) é uma doença genética complexa do miocárdio com um padrão de transmissão autossómico dominante e uma prevalência de 1:500, sendo a principal causa de morte súbita em jovens e atletas. É histologicamente caracterizada por uma hipertrofia e desarranjo da arquitectura tecidular a nível dos cardiomiócitos acompanhada por fibrose intersticial. Mais de 30 genes foram já associados ao desenvolvimento de MH, incluindo os genes sarcoméricos *ACTC1*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1* e *TTN*. Actualmente, o diagnóstico genético desta patologia é efectuado por sequenciação automática (SA), estando limitado à análise de apenas cinco genes, dado os consideráveis custos associados e o elevado número de genes e mutações envolvidas na MH. Neste contexto surge a plataforma de aplicação em larga escala, Desnaturação de Alta Resolução (HRM). Esta plataforma permite a detecção de qualquer tipo de alteração em sequências de DNA em cadeia dupla, de modo eficiente e mais económico, tendo já resultados comprovados noutras patologias. Neste trabalho, pretendeu-se validar a aplicação da técnica de HRM ao diagnóstico genético de MH, e estudando um pequeno grupo de pacientes de MH. Para tal, foram construídos e testados no termociclador *LightCycler 480*<sup>®</sup> 195 pares de *primers* para a amplificação por PCR das regiões codificantes de 24 genes associados a MH, tendo sido atingidas as condições reaccionais óptimas para aproximadamente 75% destes. Estas condições foram seguidamente aplicadas para o estudo genético de 22 indivíduos com fenótipo, suspeita clínica ou história familiar de MH. Foram analisadas por HRM 62 regiões genómicas em 12 genes associados a MH, tendo sido detectadas 41 alterações. Destas, foram confirmadas por SA três novas mutações *missense* nos genes *TNNT2* (c.722 A>T (p.Lys241Met)), *MYH7* (c.671 A>T (p.Asn224Ile)) e *MYBPC3* (c.817 C>T (p.Arg273Cys)); seis variantes silenciosas nos genes *MYBPC3*, *MYH7* e *CSRP3*; um SNP raro anteriormente descrito e de significado desconhecido no gene *MYBPC3* e uma alteração intrónica no gene *TNNI3*. Aguardam-se ainda vários resultados de SA. Até à data com uma taxa de falsos positivos de 0%, a técnica de HRM diminuiu drasticamente a necessidade de SA, diminuindo os custos para o paciente e tempo de espera dos resultados. Esta técnica pode assim ser considerada uma excelente estratégia de diagnóstico de patologias complexas como é exemplo a MH.

**Palavras-Chave:** Miocardiopatia Hipertrófica, Diagnóstico genético, Desnaturação de Alta Resolução, Genes sarcoméricos, Genes do disco Z.

## Lista de Abreviaturas

A - Adenina

a.a. - aminoácido

*ACTA1* – Actina  $\alpha$ 1, músculo esquelético

*ACTC1* – Actina cardíaca

*ACTN2* –  $\alpha$ -actinina 2

*ANKRD1* – Domínio 1 de repetição da anquirina

ADP – Adenosina difosfato

Ala – Alanina

Arg - Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Aspartato

ATP – Adenosina trifosfato

C – Citosina

*CALR3* – Calreticulina 3

*CASQ2* - Calsequestrina 2

*CAV3* – Caveolina 3

$\text{Ca}^{2+}$  – Cálcio

CP – *Crossing point*

*COX15* – Proteína de montagem do citocromo C oxidase

*CSRP3* – Proteína LIM do músculo cardíaco

Cys – Cisteína

*DES* – Desmina

DGGE – Electroforese em gel de gradiente desnaturante, do inglês *Denaturing Gradient Gel Electroforesis*

dHPLC - Cromatografia líquida desnaturante de alta eficiência, do inglês *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *desoxyribonucleic acid*

dNTPs – desoxinucleósidos

*ECA1* – Enzima conversora da angiotensina-1

*ECA2* – Enzima conversora da angiotensina-2

E.D.T.A. – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ECG – Electrocardiograma  
 ECHO – Ecocardiograma  
 E.U.A. – Estados Unidos da América  
 FXN – Frataxina  
 G - Guanina  
 gd-RMC – Ressonância magnética cardíaca com contraste de *gandolinium*  
 Gln – Glutamina  
 Glu – Glutamato  
 Gly – Glicina  
 His – Histidina  
 HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*  
 HRM – Desnaturação de alta resolução, do inglês *High Resolution Melting*  
 Ile – Isoleucina  
 JPH2 – Junctofilina 2  
 kDa – Quilo daltons  
 LAMP2 – Proteína de membrana 2 associada ao lisossoma  
 Leu – Leucina  
 Lys – Lisina  
 MAPPIT – *Mammalian Protein-Protein Interaction Trap*  
 Met – Metionina  
 MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
 MH – Miocardiopatia Hipertrófica  
 Min – Minutos  
 mM – Milimolar  
 MS – Mutação Silenciosa  
 MYBPC3 – Proteína C de ligação à miosina cardíaca  
 MYH6 – Cadeia pesada  $\alpha$  da miosina  
 MYH7 – Cadeia pesada  $\beta$  da miosina  
 MYL2 – Cadeia leve regulatória da miosina  
 MYL3 – Cadeia leve essencial da miosina  
 MYLK2 – Cinase 2 da cadeia leve da miosina  
 MYO6 – Miosina VI

*MYOZ2* – Miozenina 2

ng – Nanograma

*OBSCN* – Obscurina

Pb – Pares de bases

PCR – Reacção em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

Phe – Fenilalanina

Pi – Fosfato inorgânico

*PLN* – Fosfolamban

*PRKAG2* – Subunidade  $\gamma$ -2 da proteína cinase dependente de AMP

Pro – Prolina

*RAF1* - Homólogo 1 do oncogene viral da leucemia dos murganhos (v-raf 1)

SA – Sequenciação automática

Seg – Segundos

Ser – Serina

*SLC25A4* – Membro 4 da família 25 de transportadores de solutos

SNP - Polimorfismo de um único nucleótido, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*

T - Timina

Ta – Temperatura de emparelhamento, do inglês *annealing*

*TCAP* – Teletonina

Thr – Treonina

Tm – Temperatura de desnaturação, do inglês *melting*

Trp – Triptofano

*TNNC1* – Troponina cardíaca C

*TNNI3* – Troponina cardíaca I

*TNNT2* – Troponina cardíaca T

*TPM1* –  $\alpha$ -tropomiosina

*TTN* – Titina

Val – Valina

VCL – Vinculina

VE – Ventrículo esquerdo

$\mu$ L – Microlitro

$\mu$ M – Micromolar

% (p/v) – Percentagem peso/volume

# Índice Geral

|  | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| Agradecimentos   | iii           |
| Sumário  | iv            |
| Palavras-Chave   | iv            |
| <br>   |               |
| Lista de Abreviaturas  | v             |
| Índice Geral   | viii          |
| Índice de Figuras  | xi            |
| Índice de Tabelas  | xiii          |
| <br>   |               |
| I. Introdução  | 1             |
| 1. Miocardiopatia Hipertrófica                               | 1             |
| 1.1. Manifestações Clínicas e Diagnóstico da MH              | 1             |
| 1.2. MH e Atletas de Alta Competição                         | 4             |
| 1.3. MH como Doença Genética                                 | 4             |
| 1.3.1. Fenocópias  | 7             |
| 1.3.2. Genes Modificadores                                   | 8             |
| 2. Fisiologia Celular dos Cardiomiócitos                     | 9             |
| 2.1. Mecanismo de Contração Muscular                         | 10            |
| 3. Genética Molecular da MH                                  | 12            |
| 3.1. Patofisiologia da MH                                    | 12            |
| 3.2. Genes e Proteínas Associados a MH                       | 13            |
| 3.2.1. Genes e Proteínas Sarcoméricos                        | 13            |
| 3.2.1.1. Filamentos Finos e Componentes da Banda I           | 13            |
| 3.2.1.1.1. Actina ( <i>ACTC1</i> )                           | 13            |
| 3.2.1.1.2. $\alpha$ -Tropomiosina ( <i>TPM1</i> )            | 14            |
| 3.2.1.1.3. Troponina C ( <i>TNNC1</i> )                      | 15            |
| 3.2.1.1.4. Troponina I ( <i>TNNI3</i> )                      | 15            |
| 3.2.1.1.5. Troponina T ( <i>TNNT2</i> )                      | 16            |
| 3.2.1.2. Filamentos Grossos                                  | 16            |
| 3.2.1.2.1. Cadeia Pesada $\alpha$ da Miosina ( <i>MYH6</i> ) | 16            |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.1.2.2. Cadeia Pesada $\beta$ da Miosina ( <i>MYH7</i> )                                 | 17 |
| 3.2.1.2.3. Cadeias Leves Regulatória ( <i>MYL2</i> ) e Essencial ( <i>MYL3</i> ) da Miosina | 18 |
| 3.2.1.2.4. Proteína C de Ligação à Miosina ( <i>MYBPC3</i> )                                | 18 |
| 3.2.2. Titina ( <i>TTN</i> )  | 19 |
| 3.2.3. Genes e Proteínas do Disco Z   | 19 |
| 3.2.3.1. Teletonina ( <i>TCAP</i> )   | 19 |
| 3.2.3.2. Proteína LIM do Músculo Cardíaco ( <i>CSRP3</i> )                                  | 20 |
| 4. Diagnóstico Genético de MH   | 20 |
| 4.1. Desnaturação de Alta Resolução   | 21 |
| 5. Objectivos do Trabalho   | 24 |
| II. Materiais e Métodos   | 25 |
| 1. Amostragem   | 25 |
| 2. Extracção e Quantificação de DNA   | 26 |
| 3. Desenho de Iniciadores ( <i>Primers</i> )  | 26 |
| 4. Optimização das Condições Reaccionais para Amplificação dos Genes Associados a MH        | 27 |
| 5. Rastreio de mutações em Larga Escala por HRM   | 28 |
| 6. Sequenciação   | 29 |
| III. Resultados e Discussão   | 31 |
| 1. Optimização da Técnica de HRM  | 31 |
| 2. Rastreio de Mutações em Larga Escala por HRM   | 33 |
| 2.1. Alterações no Gene <i>ACTC1</i>  | 34 |
| 2.2. Alterações no Gene <i>CSRP3</i>  | 35 |
| 2.3. Alterações no Gene <i>MYBPC3</i>   | 37 |
| 2.4. Alterações no Gene <i>MYH6</i>   | 41 |
| 2.5. Alterações no Gene <i>MYH7</i>   | 42 |
| 2.6. Alterações no Gene <i>MYL2</i>   | 45 |
| 2.7. Alterações no Gene <i>TNNI3</i>  | 46 |
| 2.8. Alterações no Gene <i>TNNT2</i>  | 46 |
| IV. Conclusão e Perspectivas Futuras  | 52 |
| V. Bibliografia   | 54 |
| VI. Apêndices   | 65 |

|  |     |
|--|-----|
| Apêndice I – Condições Reacionais Aplicadas em Termociclador e em <i>LightCycler 480</i> <sup>®</sup>                                      | 65  |
| Apêndice II – Construção de Novos <i>Primers</i>   | 70  |
| Anexos   | xiv |
| Anexo I - <i>Primers</i> utilizados nas reacções de HRM e suas características   | xv  |
| Anexo II – Artigo: <i>Genetic Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy using Mass Spectrometry DNA Arrays and High Resolution Melting.</i> | xxi |

## Índice de Figuras

|  | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| <b>Figura 1.</b> Os vários tipos de hipertrofia cardíaca do VE.  | 1             |
| <b>Figura 2.</b> Características anatómicas e histológicas da MH.  | 2             |
| <b>Figura 3.</b> Ritmo cardíaco em ECG.  | 3             |
| <b>Figura 4.</b> Histologia típica de MH em comparação com histologia típica de hipertrofia causada por mutação no gene <i>PRKAG2</i> .                                  | 8             |
| <b>Figura 5.</b> Histologia do músculo esquelético em oposição à histologia do músculo cardíaco.   | 9             |
| <b>Figura 6.</b> Imagem de microscopia electrónica de um sarcómero.  | 10            |
| <b>Figura 7.</b> Representação esquemática de parte de um sarcómero evidenciando a interacção e a localização das proteínas dos filamentos finos e grossos e do disco Z. | 11            |
| <b>Figura 8.</b> O sarcómero origina contracção muscular através do deslizamento dos miofilamentos.  | 12            |
| <b>Figura 9.</b> Estrutura cristalina do monómero de actina do coelho (1J6Z.pdb).  | 14            |
| <b>Figura 10.</b> Representação 3-D do complexo de troponinas (1J1D.pdb).  | 16            |
| <b>Figura 11.</b> Representação esquemática da estrutura da miosina.   | 17            |
| <b>Figura 12.</b> Devido ao emparelhamento imperfeito das cadeias de DNA, dá-se a formação tanto de homoduplexes como de heteroduplexes.                                 | 22            |
| <b>Figura 13.</b> Exemplo de um gráfico de curvas de desnaturação.   | 23            |
| <b>Figura 14.</b> Etapas de análise necessárias até à obtenção do <i>difference plot</i> .   | 23            |
| <b>Figura 15.</b> Representação gráfica da situação final da optimização das condições reaccionais <i>LightCycler 480</i> <sup>®</sup> .                                 | 32            |
| <b>Figura 16.</b> Estratégia aplicada para a selecção de par de <i>primers</i> para o exão 16(2) do gene <i>TNNT2</i> .  | 32            |
| <b>Figura 17.</b> Alterações detectadas por HRM no exão 6 do gene <i>ACTC1</i> .   | 35            |
| <b>Figura 18.</b> Alterações detectadas em HRM no exão 3 do gene <i>CSRP3</i> .  | 36            |
| <b>Figura 19.</b> Cromatograma referente à mutação c.150 G>A (p.Ala50Ala) no gene <i>CSRP3</i> exão 3 no indivíduo A05.  | 36            |
| <b>Figura 20.</b> Alterações detectadas por HRM no gene <i>MYBPC3</i> .  | 37            |



|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 21.</b> Cromatograma referente ao polimorfismo c.565 G>A (p.Val189Ile) detectado no exão 5 do gene <i>MYBPC3</i> no indivíduo A03.  | 38 |
| <b>Figura 22.</b> Cromatograma referente à mutação c.817 C>T (p.Arg273Cys) detectada no exão 7 do gene <i>MYBPC3</i> do doente MH002.   | 39 |
| <b>Figura 23.</b> Estrutura molecular da arginina e da cisteína.  | 39 |
| <b>Figura 24.</b> Pesquisa em 50 indivíduos para a mutação c.817 C>T (p.Arg273Cys).   | 40 |
| <b>Figura 25.</b> Cromatogramas referentes às alterações detectadas nos controlos.  | 41 |
| <b>Figura 26.</b> Alteração detectada por HRM no gene <i>MYH6</i> exão 3.   | 41 |
| <b>Figura 27.</b> Alterações detectadas por HRM no gene <i>MYH7</i> .   | 42 |
| <b>Figura 28.</b> Cromatogramas referentes à alteração c.671 A>T (p.Asn224Ile).   | 43 |
| <b>Figura 29.</b> Alinhamento da sequência obtida a partir dos cromatogramas apresentados na figura 28 com a sequência normal do gene <i>MYH7</i> (NCBI, Blastn) e comparação com a grelha de leitura da proteína codificada. | 44 |
| <b>Figura 30.</b> Estruturas moleculares da asparagina e isoleucina.  | 44 |
| <b>Figura 31.</b> Cromatogramas referentes às mutações silenciosas identificadas no exão 12 do gene <i>MYH7</i> .   | 45 |
| <b>Figura 32.</b> Alteração detectada por HRM no exão 3 do gene <i>MYL2</i> .   | 45 |
| <b>Figura 33.</b> Alterações detectadas por HRM no exão 1 do gene <i>TNNI3</i> .  | 46 |
| <b>Figura 34.</b> Alterações detectadas por HRM no gene <i>TNNT2</i> .  | 47 |
| <b>Figura 35.</b> Cromatograma e alinhamento de sequências referentes à substituição no intrão 6.   | 48 |
| <b>Figura 36.</b> Cromatograma referente à mutação c.722 A>T (p.Lys241Met).   | 48 |
| <b>Figura 37.</b> Estrutura molecular da lisina e da metionina.   | 49 |

## Índice de Tabelas

|   | <i>Página</i> |
|---|---------------|
| <b>Tabela 1.</b> Genes sarcoméricos e mutações envolvidas na MH descritas até à data. | 6             |
| <b>Tabela 2.</b> Genes não sarcoméricos associados ao desenvolvimento de MH.          | 7             |
| <b>Tabela 3.</b> Indivíduos em estudo e respectivas informações clínicas.             | 25            |
| <b>Tabela 4.</b> Alterações detectadas por HRM nas amostras em estudo.                | 34            |
| <b>Tabela 5.</b> Alterações detectadas por HRM e confirmadas por SA.                  | 50            |

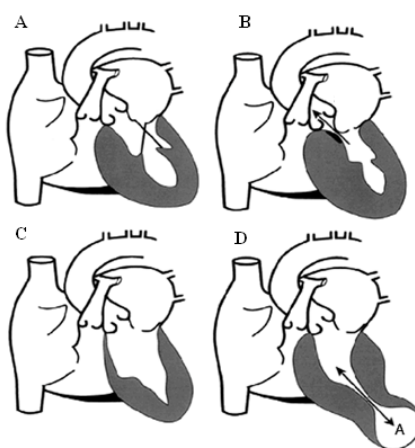
# INTRODUÇÃO

## 1. Miocardiopatia Hipertrófica

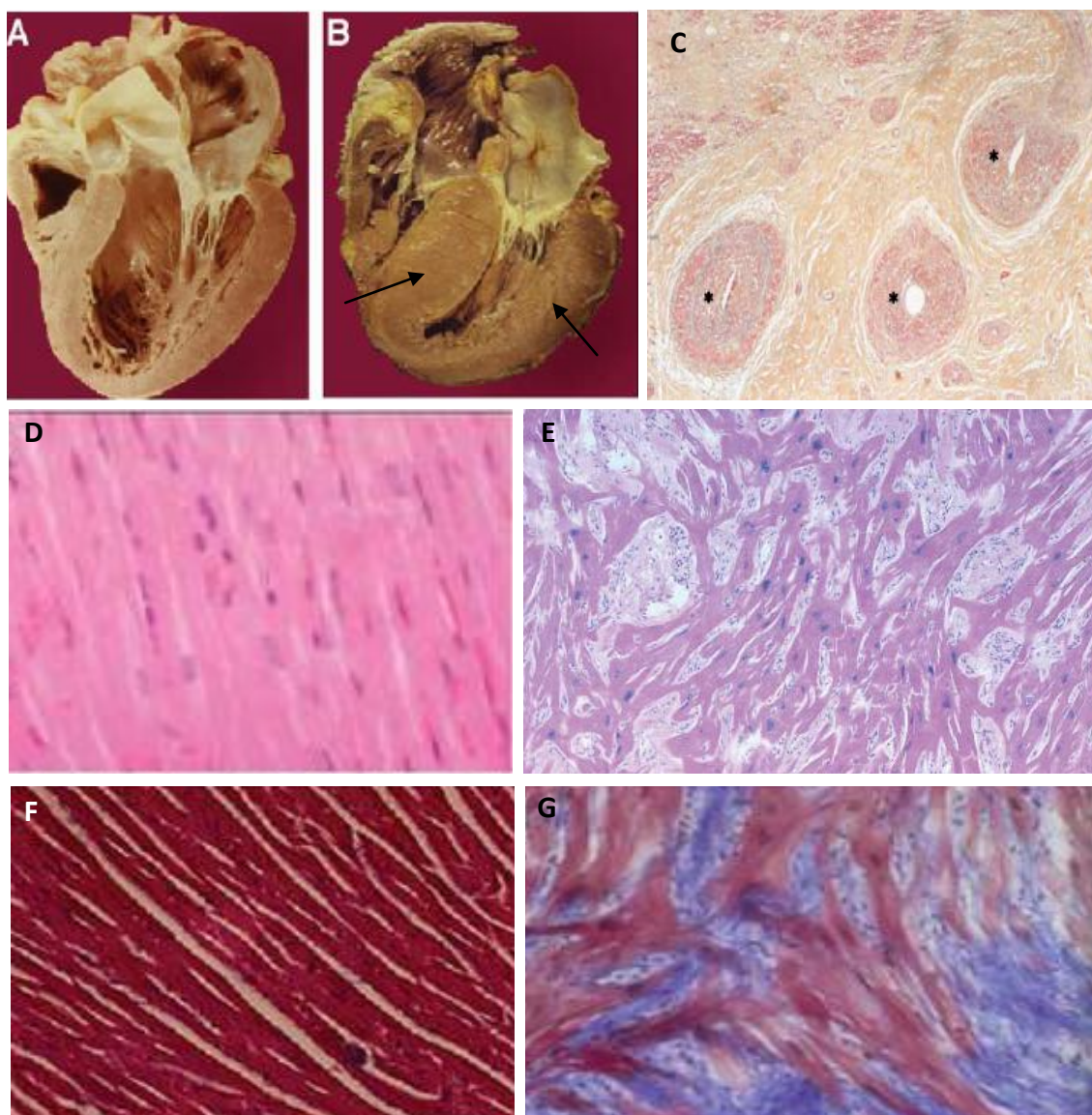
As miocardiopatias são doenças do músculo cardíaco associadas a disfunção cardíaca, estando actualmente classificadas em cinco categorias de acordo com critérios morfológicos e funcionais: miocardiopatia hipertrófica (MH), miocardiopatia dilatada, miocardiopatia restritiva, displasia ventricular direita arritmogénica e não-compacção ventricular esquerda (Hershberguer *et al*, 2009; Fatkin e Graham, 2002). A MH é a mais comum doença genética do foro cardiovascular, apresentando uma prevalência na população adulta de cerca de 0,2%, ou seja, 1:500 indivíduos, e, é a principal causa de morte súbita em jovens e atletas (Taylor *et al*, 2004; Maron, 2002; Maron *et al*, 1996).

### 1.1. Manifestações Clínicas e Diagnóstico da MH

A principal característica morfológica da MH é a hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) (Figura 1), o qual é tipicamente assimétrico com predominância do septo interventricular (Figuras 1A e 2B), conduzindo a uma obstrução ventricular durante a sístole. Histologicamente, a MH é caracterizada por uma hipertrofia e desarranjo da arquitectura tecidular a nível dos cardiomiócitos – *disarray* (Figura 2E), acompanhada pelo aumento das fibras de tecido conjuntivo – fibrose intersticial (Figura 2G) (Hughes e McKenna, 2005; Ahmad *et al*, 2005; Taylor *et al*, 2004; Robbins *et al*, 2003).



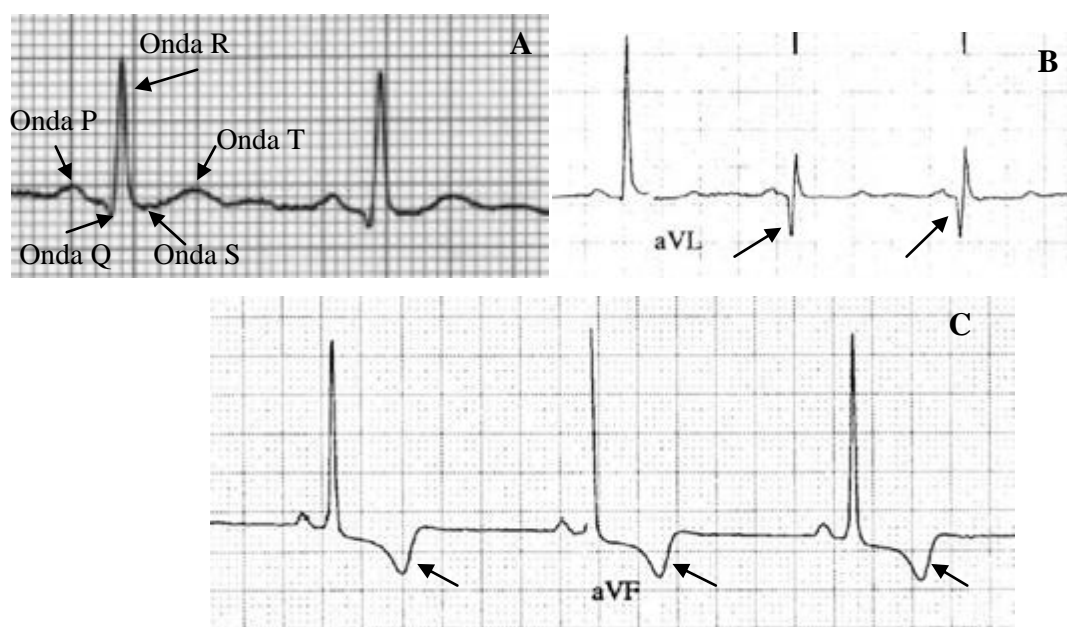
**Figura 1.** Os vários tipos de hipertrofia cardíaca do VE. (A) MH septal assimétrica, a forma mais comum de MH. (B) MH obstrutiva, em que o espessamento do miocárdio bloqueia a passagem do fluxo sanguíneo pela válvula mitral, provocando refluxo sanguíneo e os típicos murmúrios. (C) MH apical, forma não obstrutiva de MH em que a hipertrofia se encontra no ápex do VE. (D) MH localizada no centro do VE, levando à criação de um aneurisma na porção apical do VE (Fonte: [www.medscape.com](http://www.medscape.com)).



**Figura 2.** Características anatômicas e histológicas da MH. Podem ser comparadas as características morfológicas de um coração normal (A) com as de um coração hipertrófico (B), com destaque para o septo interventricular e parede lateral do ventrículo esquerdo (setas pretas). (C) Três artérias coronárias com paredes visivelmente espessadas e com lúmen reduzido (assinaladas com asterisco). Com a coloração de Hematoxilina&Eosina, é possível observar que a histologia normal do miocárdio (D) encontra-se distorcida pela hipertrofia dos miócitos, *disarray* e fibrose patentes na MH (E). Com a coloração Tricrômio de Masson, quando em comparação com tecido normal (F), é evidente o aumento da fibrose intersticial (corado a azul) na MH (G) (Adaptado de Ahmad *et al*, 2005; Hughes e McKenna, 2005; Maron, 2002).

Estas alterações são também acompanhadas por um espessamento das paredes das artérias coronárias (Figura 2C), o que provoca alterações na microvasculatura do coração (doença dos pequenos vasos), conduzindo a eventos isquêmicos responsáveis pela morte de cardiomiócitos e consequente cicatrização tecidular (Maron, 2002). Deste modo, a desorganização da

arquitetura celular aliada tanto à cicatrização miocárdial como ao aumento da matriz intersticial, predis põem a disfunção cardíaca potencialmente fatal. Este quadro é a causa primária de taquicardia e fibrilhação ventriculares, que serão os mecanismos predominantes inerentes a eventos de morte súbita (Maron, 2002). A sintomatologia típica inclui angina de peito, dispneia, palpitações, alterações do ritmo cardíaco – taquicardia, e, menos frequentemente síncope (Alcalai *et al*, 2008). Suspeitas de MH podem surgir inicialmente devidas a murmúrios (Figura 1B), história familiar positiva, novos sintomas ou padrões anormais de electrocardiograma (ECG), como alterações da repolarização, ondas T invertidas e ondas Q profundas (Figura 3) (Taylor *et al*, 2004).



**Figura 3.** Ritmo cardíaco em ECG. (A) Padrão de ECG normal (B) ECG de paciente de MH com ondas Q profundas (C) ECG de paciente de MH com inversão das ondas T (Kelly *et al*, 2007).

O ECG e a ecocardiografia cardíaca (ECHO) constituem as principais técnicas auxiliares no diagnóstico clínico de MH. A ECHO permite visualizar a existência de hipertrofia ao nível do VE ou do septo interventricular. A espessura do septo é considerada normal para valores inferiores a 12mm, sendo que em indivíduos com MH, a hipertrofia pode variar entre moderada (de 13mm a 15mm) a severa (superior a 30mm), na ausência de qualquer outro tipo de patologia que resultem secundariamente em hipertrofia ventricular, como hipertensão sistémica ou estenose da válvula aórtica (Kelly *et al*, 2007; Maron, 2002; Roberts, 2001). O diagnóstico de MH não é contudo linear, dado que nem todos os indivíduos com MH expressam a sintomatologia clínica típica acima referida e muitos têm resultados de ECG e

ECHO negativos (Maron *et al*, 2009). Dada a existência destes indivíduos de risco, alguns autores defendem a utilização de ressonância magnética cardíaca com contraste de *gadolinium* (gd-RMC) como método de diagnóstico de MH. As vantagens da gd-RMC prendem-se com a elevada resolução espacial e a imagiologia tomográfica tridimensional que permitem uma melhor caracterização dos padrões de distribuição da hipertrofia em MH (Maron *et al*, 2009).

## **1.2. MH e Atletas de Alta Competição**

Os atletas de alta competição representam um segmento único da população geral com um estilo de vida caracterizado por um exercício físico vigoroso e sistemático. É facto conhecido alguns atletas sofrerem morte súbita, normalmente devido a doença cardiovascular subjacente (Maron *et al*, 2009). A incidência exacta de morte súbita em atletas é desconhecida, mas dados dos Estados Unidos da América (EUA) sugerem que se encontre entre 1 em 200 000 e 1 em 300 000. A maioria das mortes ocorre durante ou logo após exercício físico, sugerindo que haja uma promoção de arritmias cardíacas fatais nestes indivíduos. A maioria dos casos de morte súbita em atletas é devida a cardiomiopatias hereditárias, em que a MH é a mais frequente sendo responsável por um terço destas mortes (Basavarajaiah *et al*, 2007). Dado que alguns atletas desenvolvem uma hipertrofia ventricular esquerda como resposta fisiológica normal ao exercício físico, e já que esta pode mimetizar morfologicamente a MH, a diferenciação entre esta patologia e a hipertrofia ventricular esquerda é crucial, dado que um diagnóstico errado pode ter consequências fatais. Na maioria dos casos, a diferenciação é possível com base na história familiar, ECG, tamanho da cavidade ventricular esquerda, índices de função diastólica e parâmetros de trocas gasosas cardiopulmonares. No geral, uma história familiar positiva, cavidade ventricular esquerda não dilatada, função diastólica anormal e baixos picos de consumo de oxigénio favorecem o diagnóstico de MH (Basavarajaiah *et al*, 2007). Actualmente, tanto a Sociedade Europeia de Cardiologia como o Comité Olímpico Internacional encontram-se a promover a prática de estratégias para melhoramento do *screening* com ECG de rotina a todos os atletas de alta competição (Corrado *et al*, 2005; International Olympic Committee Medical Commission, 2004).

## **1.3. MH como Doença Genética**

A MH é uma doença genética hereditária, autossómica dominante, causada por mutações nos genes que codificam para proteínas sarcoméricas. Casos esporádicos com mutações *de novo* também podem surgir e foram já reportados casos de hereditariedade autossómica recessiva

(Richard *et al*, 2006; Taylor *et al*, 2004; Keller *et al*, 2002; Wolfgang *et al*, 2001). A maioria dos indivíduos afectados são heterozigóticos para a mutação causadora de doença, sendo esta transmitida por um dos progenitores. Contudo em alguns casos podem co-existir duas ou mais mutações num mesmo indivíduo, originando situações de: heterozigotia composta – duas mutações no mesmo gene; dupla heterozigotia – duas mutações heterozigóticas em dois genes diferentes; ou homozigotia – a mesma mutação nos dois alelos para o mesmo gene (Girolami *et al*, 2010; Richard *et al*, 2006). A análise de famílias com MH nos EUA permitiu evidenciar que a maioria das mutações é “privada”, indicando que cada família tem uma mutação distinta (Keller *et al*, 2002). Contudo, foram reportados casos em que diferentes famílias possuíam as mesmas mutações (Andersen *et al*, 2009). Apesar da grande maioria das mutações ser “privada” nos EUA, noutros países a realidade é distinta (Alcalai *et al*, 2008). De facto, na Holanda e em países do sudeste asiático foi reportada a existência de mutações fundadoras e prevalentes na população (Dhandapany *et al*, 2009; Alders *et al*, 2003). A MH é também considerada como uma doença de penetrância incompleta e variável, sendo a sua severidade influenciada não só pela mutação causadora da patologia como também por factores como a idade, estilo de vida, hipertensão ou genes modificadores (Maron, 2002; Seidman e Seidman, 2001).

Até hoje foram identificados cerca de 31 genes responsáveis pelo desenvolvimento de MH (HGMD - Human Genome Mutation Data Base <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Destes, 11 codificam para proteínas do sarcómero cardíaco, componentes tanto dos filamentos finos como espessos, e com funções contrácteis, estruturais ou regulatórias. Quatro destes genes codificam proteínas dos filamentos espessos: *MYH7* (cadeia pesada  $\beta$  da miosina), *MYH6* (cadeia pesada  $\alpha$  da miosina), *MYL2* (cadeia leve regulatória da miosina) e *MYL3* (cadeia leve essencial da miosina); cinco genes codificam para a estrutura dos filamentos finos: *ACTC1* (actina cardíaca), *TPM1* ( $\alpha$ -tropomiosina), *TNNT2* (troponina cardíaca T), *TNNI3* (troponina cardíaca I) e *TNNC1* (troponina cardíaca C); dois genes codificam para proteínas estruturais: *MYBPC3* (proteína C de ligação à miosina cardíaca) e *TTN* (titina) (Richard *et al*, 2006; Marron, 2002). Os genes *MYBPC3* e *MYH7* são os principais responsáveis pelo desenvolvimento da MH, estando cada um envolvido em cerca de 30% a 40% dos pacientes genotipados. Os genes *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *ACTC*, *MYL2* e *MYL3* estão envolvidos em cerca de 1% a 5% dos casos (Richard *et al*, 2006). Todas as proteínas codificadas por estes genes têm diferentes papéis no ciclo de contracção e relaxamento do músculo cardíaco e contribuem para o equilíbrio energético do coração (aprofundado no

ponto 2) (Wolfgang *et al*, 2001). A análise destes genes permitiu a identificação de mais de 1000 mutações patogénicas (Tabela 1) (Ho, 2010).

**Tabela 1.** Genes sarcoméricos e mutações envolvidas na MH descritas até à data. (Adaptado de Richard *et al*, 2006; Keller *et al*, 2002).

| Gene          | Locus         | Proteína                                 | Número de Mutações* |
|---------------|---------------|--|---------------------|
| <i>MYH7</i>   | 14q11.2 – q12 | Cadeia pesada $\beta$ da miosina         | 298                 |
| <i>MYBPC3</i> | 11p11.2       | Proteína C de ligação à miosina cardíaca | 266                 |
| <i>TNNT2</i>  | 1q32          | Troponina cardíaca T                     | 55                  |
| <i>TNNI3</i>  | 19p13.4       | Troponina cardíaca I                     | 43                  |
| <i>TPM1</i>   | 15q22.1       | Tropomiosina $\alpha$                    | 21                  |
| <i>MYL2</i>   | 12q23-q24.3   | Cadeia leve regulatória da miosina       | 13                  |
| <i>MYL3</i>   | 3p21.2        | Cadeia leve essencial da miosina         | 9                   |
| <i>ACTC1</i>  | 15q11-q14     | Actina cardíaca                          | 15                  |
| <i>TNNC1</i>  | 3p            | Troponina cardíaca C                     | 11                  |
| <i>TTN</i>    | 2q31          | Titina                                   | 24                  |
| <i>MYH6</i>   | 14q11.2-q12   | Cadeia pesada $\alpha$ da miosina        | 13                  |

\* Fonte: HGMD, recuperado em Setembro 2010.

Outros genes cujas mutações têm vindo a ser associadas ao desenvolvimento de MH são aqueles que codificam para as proteínas do disco Z: *TCAP* (teletonina), *CSRP3* (proteína LIM do músculo cardíaco), *ACTN2* ( $\alpha$ -actinina 2), *VCL* (vinculina), *ANKRD1* (domínio 1 de repetição da anquirina) e *MYOZ2* (miozenina 2) (Chiu *et al*, 2010; Arimura *et al*, 2009; Geier *et al*, 2008; Osio *et al*, 2007; Vasile *et al*, 2006; Hayashi *et al*, 2004). Embora a MH seja considerada principalmente uma doença do sarcómero, existem ainda genes que codificam para proteínas envolvidas tanto na sinalização de cálcio como no metabolismo mitocondrial, respiração celular e com funções auxiliares ao sarcómero que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de MH (Tabela 2) (Gazzerro *et al*, 2010; Alcalai *et al*, 2008; Arimura *et al*, 2007; Chiu *et al*, 2007; Landstrom *et al*, 2007; Medin *et al*, 2007; Razzaque *et al*, 2007; D'amico *et al*, 2006; Muntoni *et al*, 2006; Palmieri *et al*, 2005; Van Driest *et al*, 2005; Mohiddin *et al*, 2004; Antonicka *et al*, 2003; Davis *et al*, 2001).



**Tabela 2.** Genes não sarcoméricos associados ao desenvolvimento de MH.

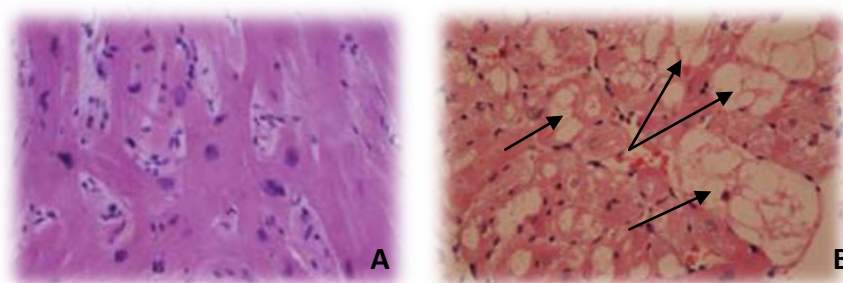
| Função   | Gene           | Locus      | Proteína   | Número de Mutações* |
|--|----------------|------------|--|---------------------|
| <b>Componentes do disco Z</b>  | <i>TCAP</i>    | 17q12      | Teletonina ou <i>Titin-cap</i>   | 14                  |
|  | <i>CSRP3</i>   | 11p15.1    | Proteína LIM do músculo cardíaco   | 14                  |
|  | <i>ANKRD1</i>  | 10q23.31   | Domínio 1 de repetição da anquirina  | 3 <sup>i</sup>      |
|  | <i>MYOZ2</i>   | 10q22.1    | Miozenina 2  | 2                   |
|  | <i>ACTN2</i>   | 1q42-q43   | $\alpha$ -actinina 2   | 8                   |
|  | <i>VCL</i>     | 10q22.2    | Vinculina  | 3                   |
| <b>Proteínas envolvidas na respiração celular / metabolismo mitocondrial</b> | <i>COX15</i>   | 10q24      | Proteína associada à montagem da estrutura do citocromo C oxidase, homólogo 15 | 4                   |
|  | <i>FXN</i>     | 9q13-q21.1 | Frataxina  | 1                   |
|  | <i>SLC25A4</i> | 4q35       | Membro 4 da família 25 de transportadores de solutos                           | 1                   |
| <b>Proteínas auxiliares do sarcômero</b>                                     | <i>DES</i>     | 2q35       | Desmina  | 1                   |
|  | <i>MYO6</i>    | 6q13       | Miosina VI   | 1                   |
|  | <i>CAV3</i>    | 3p25       | Caveolina 3  | 1                   |
|  | <i>ACTA1</i>   | 1q42.13    | Actina $\alpha$ 1, músculo esquelético   | 1                   |
|  | <i>OBSCN</i>   | 1q42.13    | Obscurina  | 1 <sup>ii</sup>     |
| <b>Proteínas envolvidas na sinalização de cálcio</b>                         | <i>JPH2</i>    | 20q13.12   | Junctofilina 2   | 4                   |
|  | <i>PLN</i>     | 6q22.1     | Fosfolamban  | 1 <sup>iii</sup>    |
|  | <i>CALR3</i>   | 19p13.11   | Calreticulina 3  | 2 <sup>iv</sup>     |
|  | <i>CASQ2</i>   | 1p13-p11   | Calsequestrina 2   | 1 <sup>iv</sup>     |
|  | <i>MYLK2</i>   | 20q13.31   | Cinase 2 da cadeia leve da miosina   | 2                   |
| <b>Outros</b>  | <i>RAF1</i>    | 3p25       | Homólogo 1 do oncogene viral da leucemia dos murganhos (v-raf 1)               | 1                   |

\* Fonte: HGMD – Setembro 2010. <sup>i</sup> Fonte: Arimura *et al*, 2009. <sup>ii</sup> Fonte: Arimura *et al*, 2007. <sup>iii</sup> Fonte: Medin *et al*, 2007. <sup>iv</sup> Fonte: Chiu *et al*, 2007.

### 1.3.1. Fenocópias

É ainda necessário distinguir a MH causada por mutações nos genes anteriormente referidos, da hipertrofia cardíaca causada por mutações em genes que codificam para proteínas metabólicas, as quais causam uma miocardiopatia metabólica. De facto, estas hipertrofias eram erradamente classificadas dado apresentarem fenótipos semelhantes a MH (Ahmad *et al*,

2005). No entanto, apresentam padrões histológicos distintos. Por exemplo, mutações no gene *PRKAG2* (subunidade  $\gamma$ -2 da proteína cinase dependente de AMP) causam acumulação de glicogénio nos cardiomiócitos (Figura 4), enquanto mutações no gene *LAMP2* (proteína de membrana 2 associada ao lisossoma) causam acumulação de vacúolos autofágicos contendo produtos celulares por degradar. Estes dados sugerem uma relação entre a hipertrofia causada por mutações nestes genes e a hipertrofia encontrada noutras doenças metabólicas como as doenças de Pomp e de Fabri, em que os cardiomiócitos acumulam produtos celulares atípicos. Contudo, estas alterações deverão definir um grupo de hipertrofias como miocardiopatias de armazenamento, não devendo ser classificadas como MH (Alcalai *et al*, 2008; Ahmad *et al*, 2005).



**Figura 4.** Histologia típica de MH (A) em comparação com histologia típica de hipertrofia causada por mutação no gene *PRKAG2* (B). São evidentes os inúmeros depósitos de glicogénio existentes neste tecido cardíaco (setas pretas) (Adaptado de Ahmad *et al*, 2005).

### 1.3.2. Genes Modificadores

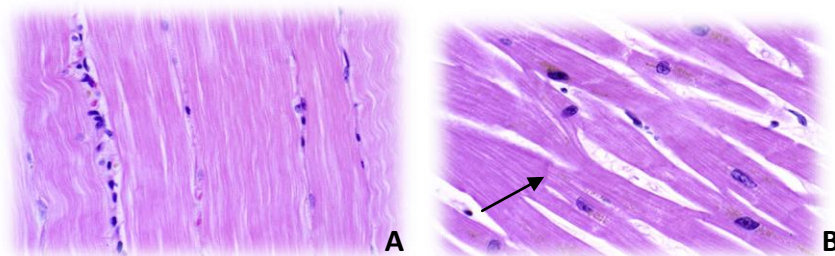
Os genes modificadores também podem afectar a expressão fenotípica das mutações envolvidas na MH. Os mais importantes parecem ser os genes envolvidos no sistema renina-angiotensina, tendo sido demonstrado que o gene codificante para enzima conversora da angiotensina-1 (*ECA1*) afecta o prognóstico em alguns casos: a penetrância de uma mutação associada ao gene *MYBPC3* parece ser dependente de um polimorfismo genético associado a este sistema. De facto, o alelo DD do gene *ECA1* tem sido associado a formas mais severas de hipertrofia e morte súbita em pacientes MH. É possível que a extensão da contribuição dos alelos deste gene varie para diferentes mutações e para diferentes genes (Ahmad *et al*, 2005; Bashyam *et al*, 2003). Também o gene para enzima conversora da angiotensina-2 (*ECA2*) foi associado a MH, influenciando a extensão da hipertrofia independentemente do efeito da mutação causadora de MH (Merwe *et al*, 2008). Foram ainda estudados polimorfismos noutros genes, como os codificantes para a aldosterona ou para a endotelina, mas não foram

produzidos resultados conclusivos que corroborem alguma associação com o fenótipo da MH (Ahmad *et al*, 2005; Bashyam *et al*, 2003).

## 2. Fisiologia Celular dos Cardiomiócitos

As fibras de músculo cardíaco são compostas por unidades celulares individuais – os cardiomiócitos, unidos em séries. As fibras do músculo cardíaco estão dispostas de modo biforcado formando uma rede tri-dimensional complexa, ao contrário das fibras de músculo-esquelético, que se encontram dispostas paralelamente umas às outras. A posição nuclear também varia, estando o núcleo posicionado centralmente em oposição ao núcleo periférico das fibras de músculo-esquelético (Figura 5). Outro aspecto importante é o facto das junções intercelulares dos cardiomiócitos serem feitas através de áreas da membrana celular interdigitante especializadas – os discos intercalantes, compostos por desmossomas, junções de aderência e junções comunicantes (Fatkin e Graham, 2002).

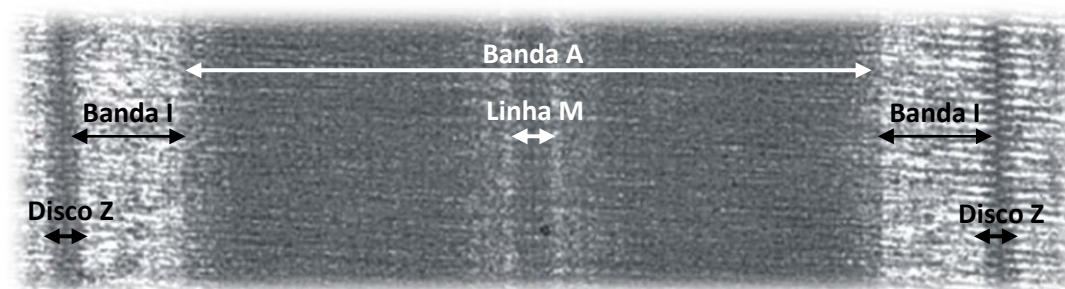
O sarcómero é a unidade estrutural e funcional fundamental do músculo, sendo composto por filamentos finos e espessos interdigitantes. Os filamentos espessos são compostos pela cadeia pesada da miosina, proteína C de ligação à miosina e pelas cadeias leves regulatória e essencial da miosina, enquanto os filamentos finos são compostos por actina cardíaca,  $\alpha$ -tropomiosina e pelo complexo de troponina (subunidades C, I e T) (Fatkin e Graham, 2002).



**Figura 5.** Histologia do músculo-esquelético (A) em oposição à histologia do músculo cardíaco (B). É evidente a forma biforcada dos cardiomiócitos, sendo bem visíveis os discos intercalantes (seta preta) (Imagens retiradas de <http://pathology.mc.duke.edu/> a 1 de Maio de 2010).

Cada sarcómero contém uma banda A (compreendida entre a sobreposição de filamentos finos e espessos), com a linha M central (composta unicamente por filamentos espessos). A flaquear a banda A encontram-se as bandas I (compostas unicamente por filamentos finos) ligadas pela linha ou disco Z (Figura 6) (Fatkin e Graham, 2002). Este é formado por uma série de proteínas ( $\alpha$ -actinina, filamina, nebulina, teletonina e miotilina) cuja função é manter a organização dos miofilamentos através da ligação da titina aos filamentos finos do

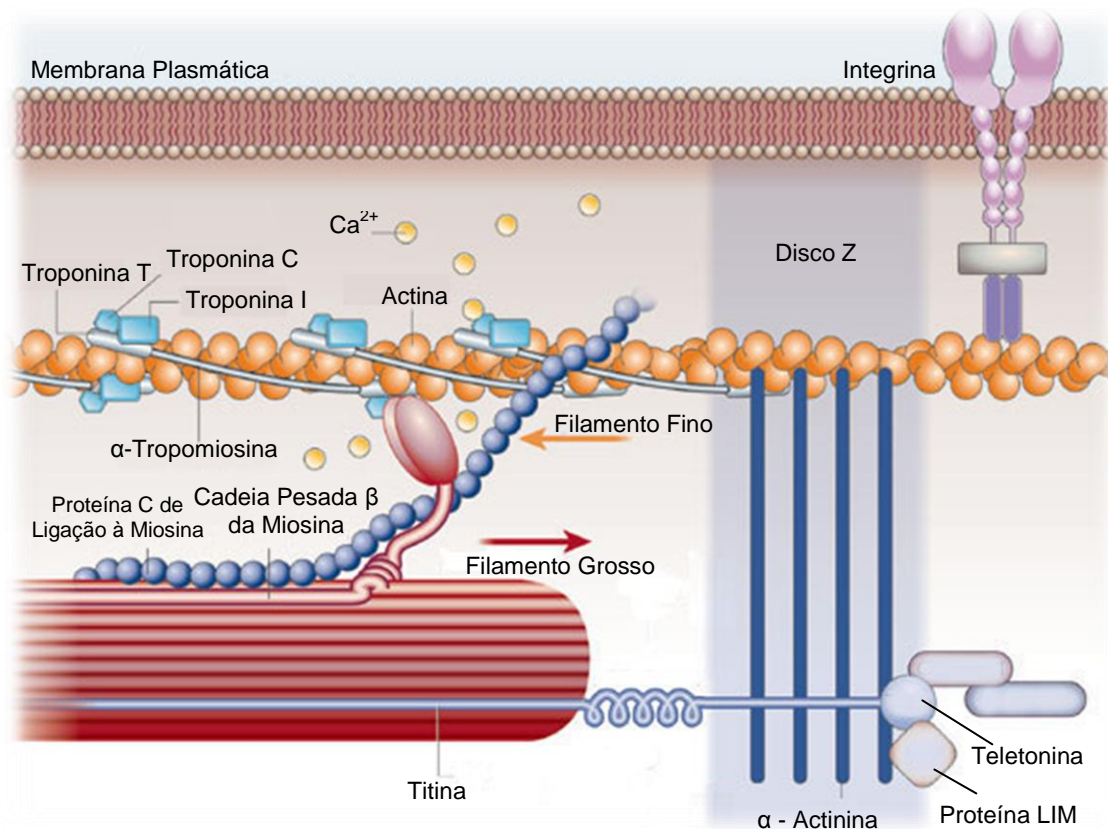
sarcómero. O citoesqueleto sarcomérico, composto maioritariamente por titina, serve de suporte estrutural aos filamentos finos e espessos (Figura 7). A titina é maior proteína humana, com 3kDa, expande-se desde o disco Z até à linha M e, para além de contribuir para o arranjo e organização do sarcómero, é um dos maiores determinantes das propriedades elásticas da miofibrilha cardíaca (Fatkin e Graham, 2002).



**Figura 6.** Imagem de microscopia electrónica de um sarcómero. A banda A está compreendida entre a sobreposição dos 2 tipos de filamentos, contendo no centro a linha M. As bandas I flanqueiam a banda A, delimitando assim um sarcómero. A banda I de um sarcómero encontra-se ligada à banda I do sarcómero adjacente através do disco Z (Adaptado de Luther, 2009).

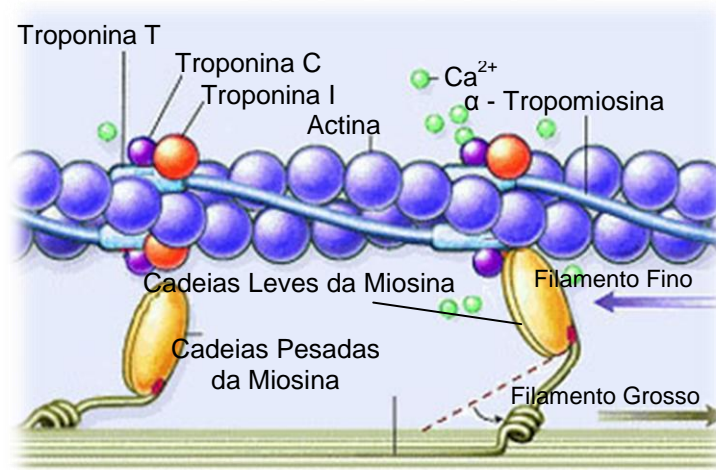
### 2.1. Mecanismo de Contração Muscular

Como acima referido, o sarcómero é a unidade funcional do músculo cardíaco sendo responsável pela contração dos cardiomiócitos. A contração ocorre através do deslizamento entre os filamentos finos e espessos dos sarcómeros, envolvendo a ligação sequencial dos filamentos espessos de miosina aos filamentos finos de actina, mudanças conformacionais na miosina dependentes de energia e ainda a separação da ligação actina-miosina. A cabeça globular da cadeia pesada da miosina contém locais de ligação tanto ao ATP como à actina (Figura 8). Deste modo, a cabeça da miosina é muitas vezes considerada como o motor dos sarcómeros (Seidman e Seidman, 2001). O complexo de troponinas é sensível à concentração intracelular de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) regulando a interacção actina-miosina. Está ancorado à  $\alpha$ -tropomiosina através das troponinas T e I, as quais interagem com a troponina C (Seidman e Seidman, 2001).



**Figura 7.** Representação esquemática de parte de um sarcômero evidenciando a interação e a localização das proteínas dos filamentos finos e grossos e do disco Z. A proteína integrina faz a ligação à membrana plasmática (Adaptado de Mudd e Kass, 2008).

Durante a diástole, a interação actina-miosina é inibida pela ligação da troponina I à  $\alpha$ -tropomiosina, estando esta última a bloquear o local de ligação da actina à miosina. Nas células musculares o  $\text{Ca}^{2+}$  encontra-se armazenado no retículo sarcoplasmático. Após um estímulo adrenérgico, o  $\text{Ca}^{2+}$  é libertado do retículo sarcoplasmático para o citoplasma, sendo aumentada a sua concentração intracelular (Seidman e Seidman, 2001). Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga à troponina C, induz uma mudança conformacional que provoca o enfraquecimento da interação entre a troponina I e a  $\alpha$ -tropomiosina libertando-a da ligação à actina e, fortalecendo a interação entre as troponinas C e I. Estas alterações conformacionais permitem a exposição do local de ligação entre a actina e a miosina, promovendo a sua interação. Deste modo, a actina fica fortemente ligada à cabeça da miosina. De seguida, uma molécula de ATP liga-se à cabeça da miosina e provoca nesta uma alteração conformacional dos seus locais de ligação à actina, fazendo com que a miosina se desloque ao longo do filamento de actina (Fatkin e Graham, 2002).



**Figura 8.** O sarcômero origina contração muscular através do deslizamento dos miofilamentos. A contração tem início quando o  $\text{Ca}^{2+}$  entra no sarcômero libertando a actina da inibição da troponina I e permitindo a sua ligação à cabeça da miosina. Por sua vez a miosina hidrolisa ATP e sofre uma série de mudanças conformacionais de modo a que o filamento espesso se desloque ao longo do filamento fino. À medida que a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  diminui, vai sendo restabelecida a inibição da interacção actina-miosina pela troponina I (Adaptado de Seidman e Seidman, 2001).

Com a hidrólise do ATP e a consequente libertação de uma molécula de ADP e outra de  $\text{P}_i$ , é gerada força (*power stroke*) e a conformação inicial da miosina não ligada à actina é restaurada. A transmissão da força gerada pelo sarcômero para o citoesqueleto do miócito ocorre através de um conjunto de proteínas incluindo a proteína C de ligação à miosina cardíaca, titina, distrofina e péptidos sarcoglicanos associados. A contração termina quando o  $\text{Ca}^{2+}$  volta ao retículo sarcoplasmático, diminuindo a sua concentração citoplasmática (Fatkin e Graham, 2002; Seidman e Seidman, 2001).

### 3. Genética Molecular da MH

#### 3.1. Patofisiologia da MH

Na MH, a maioria das mutações em heterozigotia são mutações *missense*, implicando a substituição de um aminoácido (a.a.) por outro diferente durante a tradução. Também se conhecem inserções e deleções de nucleótidos, que se em número desfazado de três, geralmente provocam mutações em *frameshift*, que implicam a alteração da grelha de leitura (Van Driest *et al*, 2004). Existem ainda descritas mutações nas regiões de *splicing*, podendo gerar proteínas truncadas (Konno *et al*, 2006). Contudo, os mecanismos moleculares inerentes a estas mutações não estão ainda totalmente elucidados (Richard *et al*, 2006). Na MH, a maioria das mutações *missense* originam proteínas mutantes estáveis sendo que tanto a



proteína mutada como a normal são expressas. Esta proteína alterada é incorporada no sarcómero e interfere com a função da proteína normal, produzindo um efeito dominante negativo na estrutura ou função do sarcómero, conduzindo ao desenvolvimento da patologia. Este efeito é também conhecido como efeito do péptido tóxico. A incorporação destas proteínas mutantes altera a função ou estrutura normal do sarcómero com o aparecimento do característico *disarray* miofibrilhar (Richard *et al*, 2006; Keller *et al*, 2002; Roberts e Sigwart, 2001). Já as mutações em *frameshift* sugerem um mecanismo de haploinsuficiência. Neste caso há a produção de um transcrito instável ou de uma proteína truncada incapaz de se incorporar no sarcómero, funcionando como um alelo nulo (Richard *et al*, 2006; Keller *et al*, 2002). Nesta situação a proteína produzida pelo alelo normal poderá não ser suficiente para manter a função normal do sarcómero (Roberts e Sigwart, 2001).

### **3.2. Genes e Proteínas Associados a MH**

Este capítulo tem como objectivo contextualizar o conhecimento existente relativo a cada um dos genes associados a MH que irão ser estudados nesta dissertação. Pretende-se associar estes genes a mutações causadoras de MH e como as alterações provocadas nas proteínas podem conduzir ao desenvolvimento de MH.

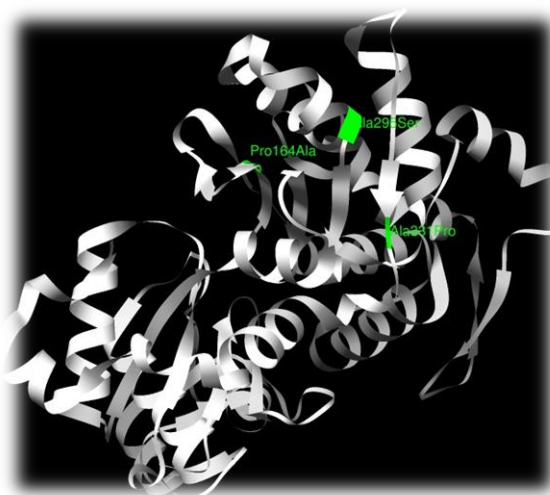
#### **3.2.1. Genes e Proteínas Sarcoméricos**

##### **3.2.1.1. Filamentos Finos e Componentes da Banda I**

###### **3.2.1.1.1. Actina (ACTC1)**

O gene *ACTC1* codifica a proteína actina cardíaca, um dos maiores constituintes dos filamentos finos do sarcómero e que está directamente envolvida na geração de força (Bashyam *et al*, 2003; Fatkin e Graham, 2002). A actina G (globular) polimeriza formando os filamentos de actina F. No seu domínio N-terminal, a actina liga-se à miosina e também interage outras proteínas sarcoméricas como o complexo de troponinas e a tropomiosina. Por sua vez, no domínio C-terminal da actina encontra-se o local de ligação à  $\alpha$ -actinina (Matsson *et al*, 2008; Fatkin e Graham, 2002). Actualmente encontram-se descritas 14 mutações *missense* e 1 pequena deleção nesta proteína associadas a MH não se tendo estabelecido até à data correlações entre os genótipos encontrados e respectivos fenótipos (Tabela 1) (HGMD). Contudo, a localização das mutações em regiões conservadas e funcionalmente importantes apoia a hipótese que as mutações no gene *ACTC1* associadas a MH afectam a contracção do sarcómero (Mogensen *et al*, 2004). As mutações Ala295Ser e Ala331Pro, por exemplo, estão

localizadas no local de ligação da actina à miosina. A alteração da polaridade deste local da proteína conduz a um enfraquecimento da interacção actina-miosina levando à ineficiente contracção do sarcómero (Figura 9) (Olson *et al*, 2000; Mogensen *et al*, 1999). Já a mutação Pro164Ala provoca alterações na ligação entre os monómeros de actina levando a uma instabilidade dos filamentos de actina (Figura 9) (Olson *et al*, 2000).



**Figura 9.** Estrutura cristalina do monómero de actina do coelho (1J6Z.pdb, Fonte: <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) A verde encontram-se identificadas os locais as mutações Ala295Ser, Ala331Pro e Pro164Ala.

#### 3.2.1.1.2. $\alpha$ -Tropomiosina (TPM1)

O gene *TPM1* é um membro da família das tropomiosinas que codifica várias isoformas geradas por *splicing* alternativo. A isoforma cardíaca é codificada a partir de 284 a.a. distribuídos por 10 exões sendo expressa tanto no miocárdio como em músculos de contracção rápida. A isoforma da proteína  $\alpha$ -tropomiosina cardíaca é composta por duas hélices dispostas em *loop*, dispondo-se no sulco maior dos filamentos de actina, estando também intimamente ligada ao complexo de troponinas. A  $\alpha$ -tropomiosina confere rigidez e estabilidade aos filamentos finos. As primeiras mutações neste gene associadas a MH foram descritas por Thierfelder e colaboradores (Thierfelder *et al*, 1994) e até à data foram já descritas 21 mutações *missense* (Tabela 1) (HGMD). Mutações como Ala63Val, Lys70Thr, Glu62Gln ou Val95Ala alteram a ligação da  $\alpha$ -tropomiosina à actina enquanto outras como Asp175Asn ou Glu180Gly alteram a ligação da  $\alpha$ -tropomiosina à troponina C sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Thierfelder *et al*, 1994; Yamauchi-Takahara *et al*, 1996; Bonne *et al*, 1998; Fatkin e Graham, 2002; Jongbloed *et al*, 2003).

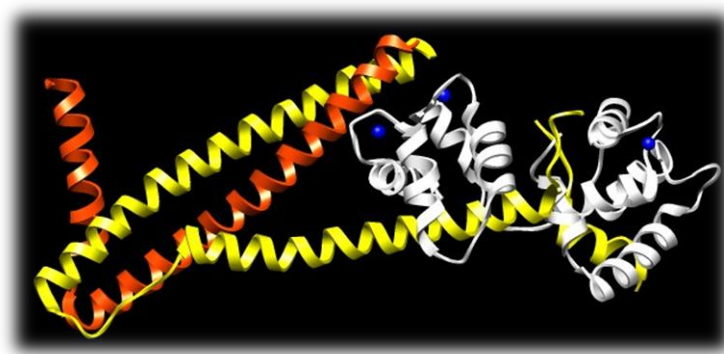


#### 3.2.1.1.3. Troponina C (*TNNC1*)

O gene *TNNC1* codifica a proteína troponina cardíaca C, a qual tem dois locais de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo apenas um funcional (Fatkin e Graham, 2002). A ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  à troponina C induz mudanças conformacionais no complexo troponina-tropomiosina o que suprime a inibição exercida sobre os filamentos finos, permitindo o início da contracção muscular (Harada e Morimoto, 2004). Em 2001, Hoffman e colaboradores identificaram a primeira mutação no gene *TNNC1* associada ao desenvolvimento de MH. A mutação missense Leu29Gln altera o local de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  não funcional e interfere com a ligação da troponina C à troponina I (Schmidtmann *et al*, 2005; Hoffman *et al*, 2001). Já as mutações Ala8Val e Asp145Glu provocam alterações na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  as quais têm como consequência alterações na geração de força contráctil (Landstrom *et al*, 2008). Até à data foram já descritas 11 mutações *missense* associadas a MH (Tabela 1) (HGMD).

#### 3.2.1.1.4. Troponina I (*TNNI3*)

O gene *TNNI3* codifica a proteína troponina I, a subunidade inibitória do complexo de troponinas (Figura 10) (Bashyam *et al*, 2003). A principal função da troponina I é inibir a interacção entre a actina e a miosina (Harada e Morimoto, 2004). Esta proteína possui vários domínios funcionais: 1) um domínio que N-terminal que contém dois resíduos de serina cuja fosforilação altera a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2) um local de ligação com a troponina cardíaca C; 3) uma região inibitória que interage com a actina e, 4) o domínio C-terminal o qual é essencial para a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  dos miofilamentos (Bonne *et al*, 1998). Actualmente estão descritas mais de 40 mutações no gene *TNNI3* associadas a MH, mutações tanto *missense*, como pequenas e grandes deleções (Tabela 1) (HGMD). A maioria das mutações no gene *TNNI3* afecta processos regulatórios da proteína troponina I aumentando a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  na contracção do músculo cardíaco (Bashyam *et al*, 2003). A deleção  $\Delta\text{Lys183}$  é a mutação mais estudada no que se relaciona com o efeito fenotípico e está envolvida num prognóstico mais severo (Harada e Morimoto, 2004). Esta mutação pode conduzir ao espessamento da parede septal e a padrões anormais de onda Q que podem ser uma indicação para morte súbita (Bashyam *et al*, 2003). Já a mutação Arg145Gly resulta numa disfunção diastólica severa e numa diminuição da contractilidade levando a hipertrofia como um mecanismo compensatório (Bashyam *et al*, 2003). O resíduo de arginina 145 está localizado na região inibitória da troponina I que é necessário não só à inibição da actina como também à interacção com a troponina C mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Fatkin e Graham, 2002).



**Figura 10.** Representação 3-D do complexo de troponinas (1J1D.pdb Fonte: <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). A cor branca encontra-se representada a molécula de troponina C com os átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  representados a azul. Em interacção com a troponina C, encontra-se a troponina I (a amarelo), a qual por sua vez interage também com a troponina T (a cor-de-laranja).

#### 3.2.1.1.5. Troponina T (*TNNT2*)

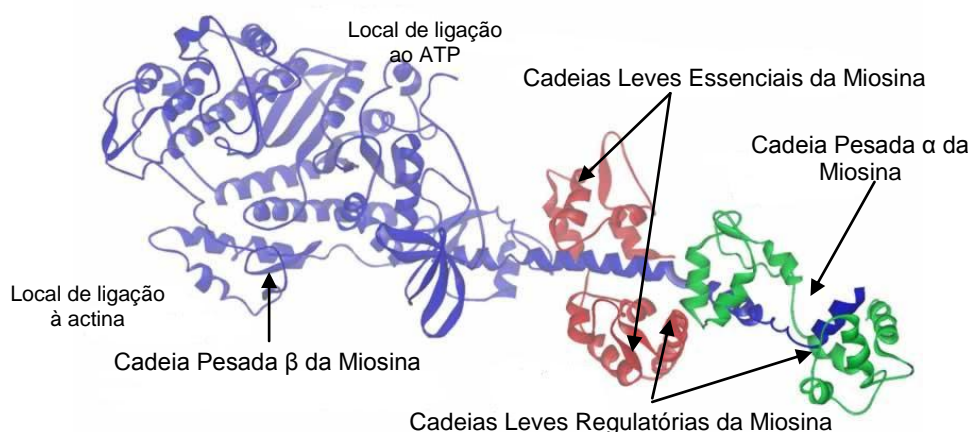
O gene *TNNT2* codifica a proteína troponina T cuja função é mover a  $\alpha$ -tropomiosina da sua ligação à actina expondo nesta os locais de ligação à miosina (Bashyam *et al*, 2003). A troponina T tem dois domínios funcionais principais: o domínio N-terminal que interage com a  $\alpha$ -tropomiosina e, o domínio C-terminal que se encontra em ligação com as troponinas C e I, e ainda com a  $\alpha$ -tropomiosina (Fatkin e Graham, 2002; Bonne *et al*, 1998). Actualmente encontram-se descritas mais de 50 mutações no gene *TNNT2* associadas a MH, tanto mutações *missense*, como deleções ou mutações nas regiões de *splicing* (Tabela 1) (HGMD). As mutações neste gene parecem estar maioritariamente associadas a um espessamento ventricular normal ou a ligeira hipertrofia, no entanto são responsáveis por uma maior frequência de eventos de morte súbita (Bashyam *et al*, 2003). Inúmeras mutações como Arg92Gln, Arg92Leu, Arg92Trp, Arg94Leu, Ala104Val, Arg130Cys,  $\Delta$ Glu160, Ser179Phe ou Glu244Asp conduzem ao aumento da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  na geração de força (Harada e Morimoto, 2004). Alterações na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  parecem ter papel fundamental na patofisiologia da falha cardíaca (Gomes e Potter, 2004).

#### 3.2.1.2. **Filamentos Grossos**

##### 3.2.1.2.1. Cadeia Pesada $\alpha$ da Miosina (*MYH6*)

A miosina do músculo cardíaco é um hexâmero constituído por duas cadeias pesadas, duas cadeias leves e duas cadeias regulatórias (Figura 11). A proteína codificada pelo gene *MYH6* é a cadeia pesada  $\alpha$  da miosina. Estão actualmente descritas 13 mutações no gene *MHY6*

associadas a MH, todas elas em domínios conservados da proteína (Tabela 1) (HGMD; Carniel *et al*, 2005). A substituição de a.a. causada pela mutação Gln1065His altera o número de pontes de hidrogénio que estabilizam a estrutura da miosina, estando esta mutação associada a um fenótipo severo (Carniel *et al*, 2005). Já a mutação Arg795Gln afecta um domínio conservado da proteína e causa potenciais distúrbios na interacção da cadeia pesada  $\alpha$  da miosina com as cadeias leves (Niimura *et al*, 2002).



**Figura 11.** Representação esquemática da estrutura da miosina. As cadeias pesadas encontram-se representadas a azul, interagindo com as cadeias leves regulatórias (a verde) e as cadeias leves essenciais (a vermelho). (Imagem retirada de <http://dir.nhlbi.nih.gov/dir/labs/lmc/images/myosinstructure.jpg> a 18 de Julho de 2010).

#### 3.2.1.2.2. Cadeia Pesada $\beta$ da Miosina (*MYH7*)

O gene *MYH7* codifica a cadeia pesada  $\beta$  da miosina (Figura 11). Esta é a maior proteína contráctil do músculo cardíaco e é responsável pela geração de força, como resultado da sua interacção com a actina através do gasto de ATP (Bashyam *et al*, 2003). A parte globular da proteína corresponde ao domínio motor que contém os locais de ligação com a actina e o ATP (Bonne *et al*, 1998). Estão actualmente descritas quase 300 mutações no gene *MYH7* associadas a MH, fazendo com que este seja um dos principais genes cujas mutações são causadoras de MH (Tabela 1) (HGMD; Richard *et al*, 2006). A maioria das mutações encontra-se agrupada em locais específicos, nomeadamente o local de interacção com a actina, afectando a velocidade do deslizamento dos filamentos, ou o local de ligação com a cadeia leve essencial, afectando a geração de movimento (Bashyam *et al*, 2003; Fatkin e Graham, 2002). Uma das mutações mais estudadas é a Arg403Gln dado que se encontra mais vezes associada a eventos de morte súbita (Bashyam *et al*, 2003). A substituição de uma arginina por uma glutamina resulta na alteração da polaridade local e estando localizada no

local de interacção com a actina conduz a um enfraquecimento da interacção actina-miosina e a alterações na geração de força (Bashyam *et al*, 2003; Fatkin e Graham, 2002).

#### 3.2.1.2.3. Cadeias Leves Regulatória (MYL2) e Essencial (MYL3) da Miosina

As cadeias leves essenciais e regulatórias da miosina são codificadas pelos genes *MYL2* e *MYL3*, respectivamente. A função de ambas as proteínas é estabilizar a região do pescoço da miosina (Figura 11). As cadeias leves, estando em proximidade dos locais de ligação da miosina ao ATP e à actina, assumem também um papel de modulação e regulação da interacção actina-miosina (Greenberg *et al*, 2009; Hernandez *et al*, 2007). Actualmente, estão descritas 9 mutações no gene *MYL3* associadas a MH e, 13 mutações no gene *MYL2* (Tabela 1) (HGMD). As mutações *missense* Asn47Lys e Arg58Gln no gene *MYL2*, por exemplo, localizam-se perto dos locais de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , alteram a capacidade deste se ligar aos filamentos, provocando assim uma redução na geração de força que poderá resultar em hipertrofia compensatória (Greenberg *et al*, 2009). A substituição Met149Val no gene *MYL3* é a mutação mais estudada neste gene, contudo os mecanismos através dos quais esta e outras mutações neste gene causam MH não são conhecidos (Hernandez *et al*, 2007).

#### 3.2.1.2.4. Proteína C de Ligação à Miosina (MYBPC3)

A proteína C de ligação à miosina é codificada pelo gene *MYBPC3*. Participa na organização dos filamentos grossos ligando-se à miosina e à titina, contribuindo para a estabilidade do sarcómero e tem ainda actividade regulatória (Bashyam *et al*, 2003). Actualmente estão descritas mais 260 mutações no gene *MYBPC3* associadas a MH e, em conjunto com as mutações do gene *MYH7* são responsáveis por cerca de 70% dos casos de MH (Tabela 1) (HGMD; Richard *et al*, 2006). Ao contrário das mutações no gene *MYH7*, as mutações no gene *MYBPC3* parecem estar associadas a hipertrofia significativa mas com bom prognóstico (Bashyam *et al*, 2003). Muitas das mutações encontradas são inserções, deleções ou alterações nas regiões de *splicing* que resultam na tradução de uma proteína truncada sem capacidade de ligação à miosina ou à titina. (Bashyam *et al*, 2003; Fatkin e Graham, 2002). Efeitos semelhantes têm algumas mutações *missense*, como por exemplo a mutação Asn755Lys, que se localiza numa região altamente conservada da proteína C, perto do local de ligação à miosina e à titina, resultando numa alteração da função da proteína C que conduz a hipertrofia cardíaca (Bashyam *et al*, 2003).

### 3.2.2. Titina (*TTN*)

O gene *TTN* codifica a proteína titina, um importante componente do sarcómero cardíaco responsável pela manutenção da organização do sarcómero e para a elasticidade miofibrilar (LeWinter *et al*, 2007; Bashyam *et al*, 2003; Fatkin e Graham, 2002). A região N-terminal da titina está ancorada no disco Z, estendendo-se esta proteína até à região da linha M onde se encontra associada à miosina e à proteína C de ligação à miosina. Na região da banda I, a titina encontra-se ligada aos filamentos finos. (LeWinter *et al*, 2007). A porção da titina localizada na banda I funciona como uma “mola” molecular, a qual não só mantém a precisão do arranjo estrutural dos filamentos finos e grossos, mas também origina uma rigidez muscular passiva importante para a função diastólica do coração (Granzier e Labeit, 2004). Em 1999, Satoh e colaboradores identificaram a primeira mutação no gene *TTN* associada a MH. A mutação Arg740Leu, localizada no exão 14, resulta no aumento da afinidade entre a titina e a actina (Satoh *et al*, 1999). Uma outra mutação *missense* descrita no exão 2 causa interferência na interacção da titina com a teletonina (Granzier e Labeit, 2004). O número de mutações no gene *TTN* associadas a MH tem vindo a aumentar, estando já descritas 24 mutações (Tabela 1) (HGMD).

### 3.2.3. Genes e Proteínas do Disco Z

Nos últimos anos, os genes que codificam para as proteínas do disco Z têm vindo a ser considerados como excelentes candidatos como responsáveis pela patogénese de MH. De facto, em alguns destes genes foram já descritas várias mutações consideradas causadoras de MH (Bos e Ackerman, 2010).

#### 3.2.3.1. Teletonina (*TCAP*)

O gene *TCAP* codifica a proteína teletonina, que interage com a titina e a proteína LIM do músculo cardíaco, entre outras (Hayashi *et al*, 2004). Em 2004, Hayashi e colaboradores identificaram a primeira mutação neste gene associada a MH, a qual provoca um aumento da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Hayashi *et al*, 2004). Actualmente encontram-se descritas 14 mutações no gene *TCAP* associadas a MH, envolvendo alterações nos locais de interacção da teletonina com outras proteínas como a proteína LIM do músculo cardíaco, titina e a proteína C de ligação à miosina (Tabela 2) (HGMD; Bos *et al*, 2006).

#### 3.2.3.2. Proteína LIM do Músculo Cardíaco (*CSRP3*)

O gene *CSRP3* codifica a proteína LIM do músculo cardíaco, ou também denominada proteína 3 rica em cisteína e glicina. Os domínios LIM são estruturas altamente conservadas que contêm dois dedos de zinco, que interagem tanto com a  $\alpha$ -actinina do disco Z como com os filamentos de actina (Fatkin e Graham, 2002). Até hoje foram associadas a MH 14 mutações no gene *CSRP3* (Tabela 2) (HGMD). Estas mutações, maioritariamente do tipo *missense*, localizam-se nos locais de interacção da proteína LIM com a  $\alpha$ -actinina e a teletonina provocando a diminuição da ligação entre estas (Bos *et al*, 2006; Geier *et al*, 2003).

#### 4. Diagnóstico Genético de MH

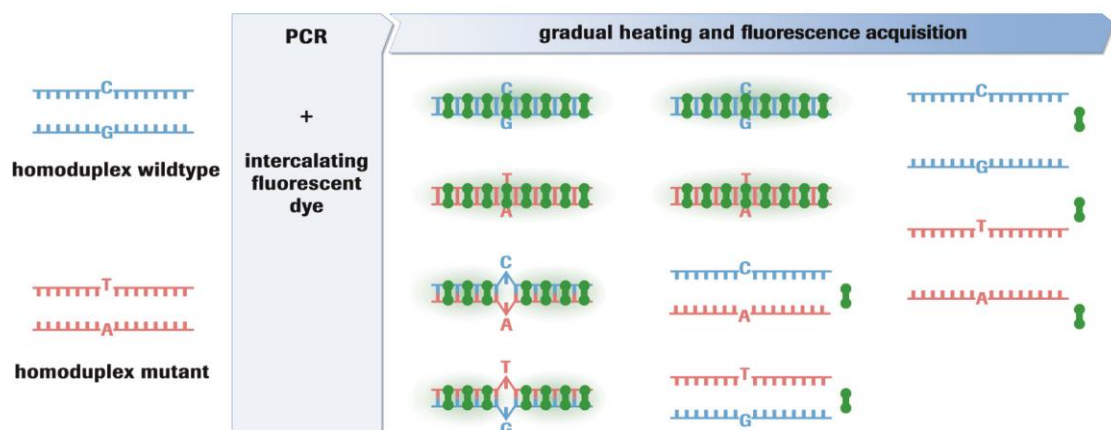
Actualmente, a metodologia mais aplicada ao diagnóstico de MH é a sequenciação automática (SA) (Rodriguez *et al*, 2009). Apesar de esta técnica ser considerada como *gold standard* para a genotipagem de mutações tanto conhecidas como desconhecidas, continua a ser relativamente dispendiosa, difícil e morosa (Norambuena *et al*, 2009). Em Portugal a SA é a tecnologia utilizada para o diagnóstico genético de MH. No entanto, a maioria dos laboratórios de diagnóstico genético em no nosso país, analisam apenas os principais genes associados a MH deixando de fora o estudo dos restantes genes sarcoméricos e de outros genes não sarcoméricos já associados ao desenvolvimento de MH (CGC Genetics [www.cgccgenetics.com](http://www.cgccgenetics.com); GeneTest [www.genetest.pt](http://www.genetest.pt); Genomed [www.genomed.pt](http://www.genomed.pt); Santos *et al*, 2010). Por exemplo, no CGC Centro de Genética o diagnóstico genético de MH baseia-se na análise dos genes *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3*, enquanto na Genomed baseia-se na análise dos genes *MYBPC3*, *MYH7*, *TPM1*, *TNNI3* e *MYL2*, e no IPATIMUP – Genetest, na análise dos genes *MYBPC3*, *MYH7* e *TNNT2*. Recentemente foram já descritos, noutros países, casos de indivíduos com MH que apresentam mais do que uma mutação no mesmo gene ou em genes distintos (Girolami *et al*, 2010; Kelly e Semsarian, 2009; 2008; Alpert *et al*, 2005; Ingles *et al*, 2005; Van Driest *et al*, 2004). Este aspecto é interessante e poderá estar na base da incapacidade de estabelecimento de verdadeiras correlações genótipo-fenótipo na nossa população. Na realidade, muitos dos laboratórios analisa numa primeira fase os genes *MYH7* e *MYBPC3* e caso descubram uma mutação num destes genes, enviam essa informação ao médico assistente do doente, interrompendo a restante análise dos restantes genes (Centro de Genética Clínica, comunicação pessoal). Deste modo, muitos dos pacientes analisados até hoje podem ter mais de uma mutação associada ao seu fenótipo. Apesar dos avanços em termos de escala da técnica de SA nas últimas décadas, esta poderá não ser a tecnologia mais

indicada para o estudo de uma patologia que envolve dezenas de genes e centenas de mutações, tornando o seu preço impraticável e o tempo muito moroso (Millat *et al*, 2010; Santos *et al*, 2010). Consequentemente, várias outras técnicas com aplicação em larga escala para a detecção de mutações têm vindo a ser desenvolvidas (Larsen *et al*, 2001). Assim técnicas como a análise de polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP, do inglês *Single Strand Conformational Polymorphism*), a electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) ou a cromatografia líquida desnaturante de alta eficiência (dHPLC, do inglês *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*) têm vindo a ser aplicadas ao diagnóstico de MH (Andersen *et al*, 2009; Bos *et al*, 2006; Larsen *et al*, 2006). No entanto, estas técnicas continuam a ser dispendiosas, para além de serem muito demoradas e envolverem inúmeras manipulações das amostras aumentando o risco de contaminações (Reed e Wittwer, 2004).

#### **4.1. Desnaturação de Alta Resolução**

É no contexto acima referido que surge uma nova técnica para detecção de mutações com aplicação em larga escala, a Desnaturação de Alta Resolução (HRM, do inglês *High Resolution Melting*), a qual permite a detecção de qualquer variação nas sequências de DNA de cadeia dupla (Stoep *et al*, 2009). A técnica de HRM é utilizada em genotipagem e rastreio de mutações, tendo a sua utilidade já sido comprovada no diagnóstico de outras patologias com causas genéticas como a fibrose quística, fenilcetonúria ou cancro da mama (Audrezet *et al*, 2008; Takano *et al*, 2008; Dobrowolski *et al*, 2007), para além da MH (Millat *et al*, 2010; Santos *et al*, 2010). Adicionalmente à detecção de mutações, a técnica de HRM tem sido aplicada para a detecção de polimorfismos de um único nucleótido (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), análise do estado de metilação de DNA e até discriminação de indivíduos (Gidlöf *et al*, 2009). O princípio da técnica de HRM baseia-se na amplificação da sequência alvo através da reacção em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) na presença um fluoróforo saturante que intercala DNA em cadeia dupla. Após a reacção de PCR em tempo real, os amplicões são brevemente desnaturados e logo de seguida re-naturados. Se a amostra de DNA for heterozigótica irão formar-se híbridos perfeitamente complementares – homoduplexes, e híbridos não totalmente complementares – heteroduplexes (Roche Diagnostics [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)). De modo a gerar uma curva de desnaturação, a temperatura é de novo aumentada, mas desta vez gradualmente, enquanto a fluorescência emitida é continuamente monitorizada (Reed *et al*, 2007). Conforme

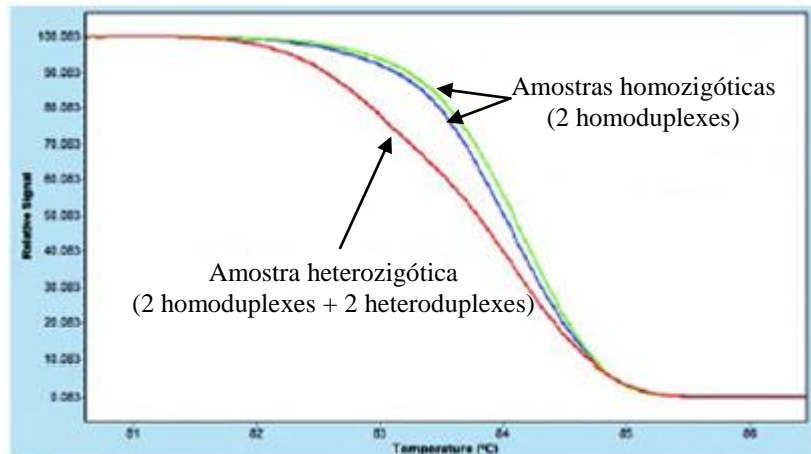
a temperatura vai aumentando, a fluorescência vai diminuindo, no início lentamente caindo depois drasticamente a uma temperatura característica, reflectindo a separação das cadeias duplas de DNA em cadeias simples (Reed *et al*, 2007). Esta temperatura, a temperatura de desnaturação ( $T_m$ , do inglês temperatura de *melting*) do *duplex* de DNA é caracterizada pelo seu conteúdo em GC, comprimento e sequência (Stoep *et al*, 2009; Reed *et al*, 2007). Assim, a intensidade relativa da fluorescência de uma amostra de DNA heterozigótica irá apresentar duas temperaturas características, devido aos diferentes ritmos de desnaturação dos homoduplexes e heteroduplexes (Figura 12) (Roche Diagnostics).



**Figura 12.** Devido ao emparelhamento imperfeito das cadeias de DNA, dá-se a formação tanto de homoduplexes como de heteroduplexes. As cadeias de DNA heteroduplexes desnaturam a temperaturas mais baixas que as cadeias homoduplexes. Esta diferença é detectada na técnica de HRM permitindo a distinção entre as amostras (Roche Diagnostics).

Deste modo, quando estes dados são transpostos para um gráfico representativo das curvas de desnaturação, em que a intensidade relativa da fluorescência está representada em função da temperatura, a forma da curva de desnaturação de uma amostra homozigótica será diferente daquela de uma amostra heterozigótica, dado representar a junção das curvas de desnaturação dos quatro diferentes duplexes formados anteriormente. Os heteroduplexes, como são menos estáveis que os homoduplexes desnaturam mais rapidamente, influenciando assim a curva de desnaturação da amostra (Figuras 12 e 13) (Roche Diagnostics).





**Figura 13.** Exemplo de um gráfico de curvas de desnaturação. Nas amostras heterozigóticas a forma da curva de desnaturação muda, dado que esta é um compósito dos componentes homoduplexes e heteroduplexes. (Roche Diagnostics).

As curvas de desnaturação devem depois ser normalizadas de modo a uniformizar todos os dados. De seguida, às curvas normalizadas é aplicado um desvio (*shift*) ao longo do eixo da temperatura para igualar o ponto em que todas as amostras de DNA em cadeia dupla desnaturam completamente. Por fim, estas curvas normalizadas e *shifted* são subtraídas a uma curva de referência de modo a que as diferenças nas curvas de desnaturação sejam mais claras. Como resultado, obtém-se um gráfico diferencial (*difference plot*) em que as amostras são agrupadas de acordo com perfis de desnaturação semelhantes (Figura 14) (Roche Diagnostics). No caso de se verificar a presença de um perfil de desnaturação anómalo, então a amostra terá potencialmente uma alteração a qual deve ser confirmada por sequenciação. Esta verificação é necessária, pois o HRM não permite identificar alteração exacta no que respeita à identificação da sequência da alteração detectada (Shih *et al*, 2010).



**Figura 14.** Etapas de análise necessárias até à obtenção do *difference plot*, em que a diferença relativa do sinal de fluorescência das amostras se encontra em função da temperatura. As setas pretas assinalam exemplos de perfis de desnaturação que podem ser considerados anómalos (Roche Diagnostics).

Com aproximadamente 100% de sensibilidade e especificidade, o HRM está ao nível de técnicas referidas anteriormente usadas para detecção de mutações (Taylor, 2009; Takano *et al*, 2008). Contudo as técnicas de SSCP, DGGE ou dHPLC requerem a separação das amostras em gel ou em outra matriz, e podem envolver o seu tratamento com reacções enzimáticas ou químicas (Reed *et al*, 2007). O facto de o HRM ser feito inteiramente em tubo fechado, torna-o uma técnica de mais fácil aplicação, diminuindo o risco de erros laboratoriais e eliminando a utilização de substâncias nocivas como a formamida ou a poliacrilamida (Krenkova *et al*, 2009; Norambuena *et al*, 2009; Taylor, 2009; Tindall *et al*, 2009). A par desta grande vantagem, está também associado um baixo custo de execução (Krenkova *et al*, 2009; Norambuena *et al*, 2009; Taylor, 2009). Embora, a técnica de HRM não permita a substituição da SA, o facto de permitir testar um grande número de amplicões numa única sessão de poucas horas, reduz dramaticamente a necessidade de sequenciação nas amostras em que não se detectam alterações, sendo assim uma excelente técnica de rastreio de mutações (Krenkova *et al*, 2009; Tindall *et al*, 2009; Vossen *et al*, 2009; Takano *et al*, 2008).

## **5. Objectivos do Trabalho**

O grupo de investigação em que este trabalho se encontra inserido está presentemente a validar a utilização conjunta de duas plataformas de aplicação em larga escala para a detecção de mutações associadas a MH. Neste âmbito, os principais objectivos deste trabalho foram a optimização da técnica de HRM aplicada ao diagnóstico de MH, e consequentemente a detecção de alterações num elevado número de genes associados a MH, num grupo de pacientes portugueses. Ao contrário do que acontece noutros países como os EUA ou a Holanda, a base genética da MH em Portugal não foi ainda amplamente estudada. A nossa realidade relativa à MH permanece assim ainda pouco conhecida. No nosso país são apenas estudados 5 a 6 genes associados a MH, pelo que as mutações conhecidas são apenas em relação a estes genes. Pretende-se igualmente com este trabalho, uma melhor caracterização das mutações associadas à nossa população, com vista a um futuro estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo.

## II. Materiais e Métodos

### 1. Amostragem

Foram recolhidos, e conservados em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 6mL de sangue periférico de 22 indivíduos, sendo 11 atletas de alta competição com suspeita ou antecedentes familiares de MH (amostras A), e 11 doentes com fenótipo de MH (amostras MH) (Tabela 3). Como controlo negativo para as mutações, foram usados indivíduos sem qualquer suspeita ou história familiar de MH (amostras C). Este estudo foi aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e todos os indivíduos assinaram um formulário de consentimento informado autorizando a análise genética.

**Tabela 3.** Indivíduos em estudo e respectivas informações clínicas.

| <b>Amostra</b>   | <b>Informação Clínica</b>                                   |
|------------------|---|
| <b>A01</b>       | História familiar de MH.                                    |
| <b>A02</b>       | Fenótipo de MH.   |
| <b>A03</b>       | Alterações em ECG.  |
| <b>A04</b>       | História familiar de MH. Alterações em ECHO.                |
| <b>A05</b>       | Alterações em ECHO.   |
| <b>A06</b>       | Alterações em ECHO e ECG.                                   |
| <b>A07</b>       | Alterações em ECHO e ECG.                                   |
| <b>A08</b>       | Alterações em ECHO e ECG.                                   |
| <b>A09</b>       | Alterações em ECG.  |
| <b>A10</b>       | Alterações em ECG.  |
| <b>A11</b>       | História familiar de MH.                                    |
| <b>MH002</b>     | Fenótipo de MH.   |
| <b>MH004</b>     | Fenótipo de MH.   |
| <b>MH007</b>     | Fenótipo de MH.   |
| <b>MH008</b>     | Fenótipo de MH.   |
| <b>MH017</b>     | Fenótipo de MH.   |
| <b>MH018</b>     | Fenótipo de MH.   |
| <b>MH030</b>     | Fenótipo de MH.   |
| <b>MH035</b>     | História familiar de MH.                                    |
| <b>MH037</b>     | História familiar de MH.                                    |
| <b>MH038</b>     | Fenótipo de MH.   |
| <b>MH041</b>     | História familiar de MH.                                    |
| <b>C01 – C50</b> | Saudáveis. Sem fenótipo de MH. Sem história familiar de MH. |

## 2. Extracção e Quantificação de DNA

Foi extraído DNA de cada um dos indivíduos (Tabela 3) a partir de 1mL de sangue total. Para tal, utilizou-se o kit *DNA Isolation Kit for Mammalian Blood* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) segundo as instruções do fabricante. O DNA obtido foi eluído em tampão TE (Tris-HCl 10mM, E.D.T.A. 1mM, pH8,0) e posteriormente quantificado por espectrofotometria no NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), utilizando como branco tampão TE. O cálculo da concentração de DNA foi efectuado utilizando a expressão:

---

A pureza foi calculada pela razão:

A integridade do DNA foi avaliada através de electroforese unidimensional em gel de agarose a 0,8% (p/v) (Agarose SeaKem®LE, Rockland Main, E.U.A.) dissolvida em tampão TAE 1x (tampão TAE 10x: 48,4g Tris-Base, E.D.T.A. 0,5M, 11,42mL Ácido Acético Glacial, pH8,0), a quente. Após o arrefecimento desta solução (temperatura cerca de 50°C) adicionou-se 3µl (por cada 100 ml de solução) de GelRed (Biotarget, Lisboa Portugal) para posterior visualização dos ácidos nucleicos num transiluminador (UVI TEC, Alfagene, Carcavelos, Portugal), acoplado a máquina fotográfica *Kodak* (AlphaDigiDoc, Alpha Innotech) com aquisição de imagem através do *software AlphEaseFC* (AlphaDigiDoc 1000, Alpha Innotech). Para a identificação dos pesos moleculares das amostras corridas em gel de agarose, utilizou-se o marcador de pesos moleculares *Hyperladder IV* (Bioline, Citomed, Lisboa, Portugal).

## 3. Desenho de Iniciadores (*Primers*)

Foram desenhados *primers* para amplificação por PCR das regiões codificantes dos genes sarcoméricos (*ACTC1*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2* e *TMP1*), do disco Z (*CSRP3*) e outros genes associados a MH (*JPH2*, *COX15*, *DES*, *FXN*, *MYO6*, *MYLK2*, *PLN*, *PRKAG2* e *SLC25A4*) de acordo com as especificações para aplicação em HRM (<http://www.gene-quantification.de/LC480-Technical-Note-01-HRM.pdf>). No desenho dos *primers* teve-se em especial consideração que o tamanho dos amplicões não deve ser superior a 250 pb de forma a assegurar uma boa eficiência das reacções de HRM. Foram

estudadas não só as regiões exónicas, como também as regiões na fronteira exão-intrão (dadora de splicing AG) e intrão-exão (receptora de splicing, CG). Para construção dos *primers* foram utilizadas as seguintes bases de dados e programas: UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) para pesquisa de sequências das regiões alvo; Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) para construção dos *primers* e garantir a sua especificidade com a região alvo; DINAMelt (<http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/>) para análise da estrutura secundária e das propriedades termodinâmicas. Os *primers* seleccionados (total de 195 pares, Anexo I) foram sintetizados e purificados por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), na Metabion (Alemanha). Para além destes *primers*, sempre que necessário por questões de optimização, foram ainda utilizados outros *primers* já existentes no laboratório para amplificação de PCR de algumas regiões consideradas *hot spot* de mutações associada a MH nos genes *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *PRKAG2*, *TPM1*, *TNNT2*, *TCAP*, *TTN*, *CAV3* e *CASQ2*. Estes *primers* embora não desenhados exclusivamente para HRM, cumprem em traços gerais os requisitos necessários (Anexo I). As sequências e características termodinâmicas de todos *primers* utilizados encontram-se descritas no Anexo I.

#### **4. Optimização das Condições Reaccionais para Amplificação dos Genes Associados a MH**

As condições reaccionais para amplificar por PCR as regiões codificantes e as regiões fronteira intrão-exão e exão-intrão dos genes sarcoméricos (*ACTC1*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TMP1* e *TTN*), do disco Z (*TCAP* e *CSRP3*) e outros genes associados a MH (*JPH2*, *COX15*, *DES*, *FXN*, *MYO6*, *MYLK2*, *PLN*, *PRKAG2*, *SLC25A4*, *CAV3*, *CASQ2*) foram optimizadas no termociclador *LightCycler 480*<sup>®</sup> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), usando para o efeito DNA extraído de sangue de indivíduos saudáveis (sem indicações de patologia ou história familiar de MH). A mistura de PCR continha a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (1U) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), tampão de PCR (1x), cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), dNTPs (200  $\mu M$ ), par de *primers*, 20ng de DNA genómico ou água (controlo negativo – branco), e, sempre que necessário foi adicionada água para ajustar o volume reaccional final a 20 $\mu L$ . As concentrações de *primers* e de  $MgCl_2$  variaram entre 0,2 e 0,5 $\mu M$ , e entre 2 e 4mM, respectivamente. Todas as reacções foram efectuadas em placas de 96 poços (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). As amostras foram então sujeitas a um passo de

pré-incubação a 95°C durante 10 min, seguido de 35 ciclos de PCR constituídos por: um passo de desnaturação a 95°C durante 10 seg, um passo de emparelhamento durante 10 seg e um passo de extensão a 72°C durante 20 seg. A temperatura de emparelhamento (Ta, do inglês temperatura de *annealing*) de cada *primer* foi calculada a partir da temperatura de desnaturação (Tm, do inglês temperatura de *melting*) (descrita no Anexo I). A Ta foi considerada 5°C abaixo da Tm tendo variado para cada par de *primers* numa gama de 55°C – 65°C. Os produtos de PCR obtidos foram analisados através de electroforese unidimensional em gel de agarose 2% (p/v) utilizando o *Hyperladder IV* (Bioline, Citomed, Lisboa, Portugal) como marcador de pesos moleculares. As condições de amplificação foram consideradas optimizadas sempre que fosse obtida uma banda única de tamanho esperado no gel de agarose.

## **5. Rastreio de mutações em Larga Escala por HRM**

Após optimizadas as condições reaccionais da reacção de PCR para a amplificação dos fragmentos de interesse (ponto 4), procedeu-se ao rastreio de mutações por HRM dos 22 indivíduos em estudo (Tabela 3). Foram utilizados como negativo de mutação (amostras referência), indivíduos saudáveis sem qualquer suspeita ou história familiar de MH (Tabela 3). O rastreio de mutações envolveu assim a análise de 62 regiões genómicas em 12 genes associados a MH. Para tal, foi utilizado o kit *LightCycler 480® High Resolution Melting Master* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), contendo o fluoróforo *Resolight Dye* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). A mistura e as condições reaccionais utilizadas no passo de amplificação inicial foram as optimizadas no ponto 4 (Apêndice I), tendo apenas como variação o facto de a mistura reaccional incluir a fluoróforo saturante de DNA em cadeia dupla, *Resolite Dye*. Após a amplificação por PCR (programa referido no ponto 4), as amostras foram desnaturadas por aquecimento até aos 95°C durante 1 min e depois arrefecidas até aos 40°C durante 1 min, de forma a permitir a formação dos homoduplexes e heteroduplexes por renaturação. Seguiu-se o passo de HRM em que as amostras foram sujeitas a um aumento contínuo da temperatura desde os 60°C até aos 90°C, com uma rampa de aumento de 1°C/seg, com 25 aquisições por grau centígrado. Todos os dados foram analisados através do *software LightCycler 480® Software versão 1.5.0.39 SP3* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Todas as amostras com amplificação posterior ao ciclo nº 30 de PCR foram excluídas da análise, pois segundo as recomendações

do fabricante podem gerar perfis de desnaturação pouco fiáveis, podendo induzir erros na análise. Por análise de *software* foram geradas curvas de desnaturação e, através da primeira derivada destas, foram gerados os picos de desnaturação a fim de detectar algum eventual erro experimental. Só foram consideradas para análise amostras com pico de desnaturação único. De seguida as curvas de desnaturação foram normalizadas em função da temperatura, de modo a que as amostras fossem directamente comparáveis. De forma a evidenciar melhor os diferentes perfis de desnaturação (diferença relativa de intensidade de fluorescência), as curvas de desnaturação normalizadas foram então representadas utilizando como linha de base a variação de fluorescência da(s) curva(s) para a(s) amostra(s) considerada(s) normal(ais) em função da temperatura (*difference plot*), onde foram considerados limites de normalidade valores compreendidos entre +2 e -2. Um amplificação foi considerado como potencialmente alterado sempre que cumprisse três requisitos: apresentar uma curva de desnaturação com uma forma diferente da curva de desnaturação dos controlos; ser colocado pelo *software* de análise num grupo de amostras separado dos controlos e, apresentar um valor de diferença relativa fora dos limites de considerados de normalidade.

## 6. Sequenciação

A técnica de SA foi utilizada para confirmação e caracterização da alteração nucleotídica subjacente aos produtos de amplificação com perfis alterados identificados por HRM. A região de DNA potencialmente alterada foi amplificada em termociclador (Multigene Gradient, Nova Jérnia, Estados Unidos da América) usando a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase*, 5U/ $\mu$ L (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) tal como descrito no ponto 4. Em cada reacção foram utilizados 20ng de DNA genómico e todos os volumes foram ajustados desta vez a um volume reaccional final de 50 $\mu$ L. Para alguns pares de *primers* foi necessário um passo de optimização adicional, dado que as condições reaccionais aplicadas em *LightCycler 480*<sup>®</sup> não se verificaram compatíveis com a amplificação em termociclador. A estratégia de optimização, ou seja variação de  $T_a$  e das concentrações de  $MgCl_2$  e de *primers*, foi igual à apresentada no ponto 4 e as condições reaccionais aplicadas encontram-se no Apêndice I. As condições reaccionais foram consideradas optimizadas sempre que se verificasse a presença de produto de amplificação específico, confirmado por electroforese unidimensional em gel de agarose a 2% (p/v). A activação da enzima e desnaturação das cadeias de DNA decorreu a a 95°C durante 10 minutos (min), seguido de 35 ciclos de PCR constituídos por: um passo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos (seg), um passo de

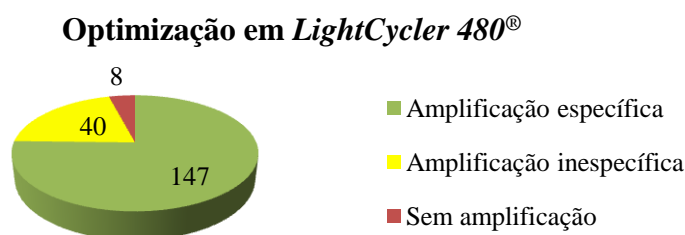
emparelhamento durante 45 seg e um passo de extensão a 72°C durante 45 seg. Por fim, seguiu-se um passo de extensão final a 72°C durante 5 min, sendo depois a reacção mantida a 4°C e mantidas a esta temperatura até posterior análise. Todos os produtos de PCR foram sujeitos a electroforese unidimensional em gel de agarose a 2% (p/v) utilizando o *Hyperladder IV* (Bioline, Citomed, Lisboa, Portugal) como marcador de pesos moleculares, sendo a banda de DNA de dimensão específica excisada e purificada utilizando o kit *EasySpin DNA Gel Extraction Kit* SP-GE-250 (Citomed, Lisboa, Portugal). A SA dos fragmentos de amplificação purificados foi realizada no Laboratório de Genética Molecular de Cardiopatias e Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra como prestação de serviço. A análise dos cromatogramas obtidos foi efectuada usando o *software* de utilização livre *Finch TV versão 1.3.1* (Geospiza Inc., Seattle, EUA).



### III. Resultados e Discussão

#### 1. Otimização da Técnica de HRM

A técnica de HRM permite identificar variações genéticas, tais como SNPs, mutações pontuais, pequenas inserções e deleções, de um modo rápido e eficiente. A criação de resultados credíveis, através de uma análise sofisticada, requer que todos os parâmetros experimentais sejam rigorosamente controlados e altamente reproduzíveis de amostra para amostra (Roche Diagnostics). A aplicação da técnica de HRM ao diagnóstico de MH exigiu o planeamento de raiz de todos os parâmetros experimentais inerentes e a aplicação de vários princípios no que respeita ao desenho cuidadoso dos ensaios experimentais nomeadamente na escolha do melhor par de *primers*, a uniformização do método de preparação das amostras, a optimização das condições reaccionais em particular das condições de amplificação e, ainda, a aplicação do melhor método de análise dos resultados obtidos. Deste modo, foram construídos 195 pares de *primers* que flaqueassem as regiões codificantes dos genes sarcoméricos e de vários outros genes não sarcoméricos mas já associados a MH. A validação experimental dos 195 pares de *primers* foi realizada no termociclador *LightCycler 480*<sup>®</sup> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) utilizando a enzima *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Neste processo foram variadas as concentrações de *primer* e de MgCl<sub>2</sub> aplicadas em cada reacção, de modo a evitar a formação de produtos inespecíficos e de dímeros de *primer* por tornar as reacções menos ou mais estridentes. Outra variável de extrema importância foi a Ta, dado esta ser a temperatura com maior influência na especificidade e robustez do PCR (Roche Diagnostics). Dos 195 pares de *primers* construídos, foram optimizadas as condições reaccionais de 147 pares em *LightCycler 480*<sup>®</sup> (75,4%) (Figura 15; Apêndice I). Estas condições reaccionais foram seguidamente aplicadas para o rastreio de mutações nos doentes com MH. No entanto, para alguns pares de *primers*, a optimização não foi um processo fácil não se tendo conseguido chegar a uma amplificação específica. Concretamente, cerca de 40 pares de *primers* (20,5%) obtiveram produtos de amplificação inespecíficos e para 8 pares de *primers* (4,1%) não se conseguiu obter um produto de amplificação (Figura 15; resultados não apresentados).

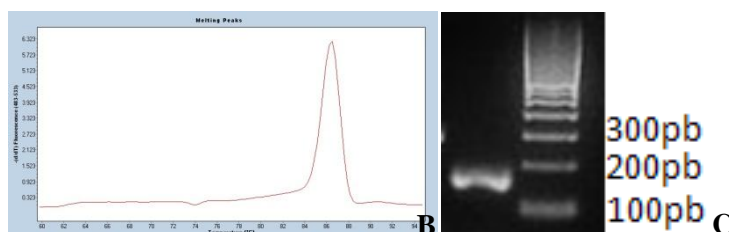


**Figura 15.** Representação gráfica da situação final da optimização das condições reaccionais *LightCycler 480*<sup>®</sup>. Os números indicados na figura referem-se aos pares de primers em análise.

Na figura 16 apresenta-se um exemplo do processo utilizado para a selecção de um par de *primers* para o exão 16 do gene *TNNT2*. Dado o exão 16 ter um tamanho superior a 250pb, este teve de ser dividido em 2 fragmentos 16(1) e 16(2), estando assinalada na Figura 16, a localização dos *primers* para a região 16(2).

tgtctccatgtcactgcgtcctgttccctgcagCTCCAAGACCCGCGGGAAGGCTAAAGTCACCGGGCGCTGGAAATA  
GAGCCTGGCCTCCTTCACCAAAGATCTGCTCCTCGCTCGCACCTGCCTCCGGCCTGCACTCCCCCAG  
TTCCCGGGCCCTCCTGGGCACCCAGG**CAGCTCCTGTTTGAAATGG**GGAGCTGGCCTAGGTGGG  
AGCCACCACTCCTGCCTGCCCCACACCACTCCACACCAGTAATAAAAAGCCACCACACACTGact  
ggcatttctgtcagtcctccctcagagagagag**agaaactgaggcgagacct**gtctctcacaggtcccc

**A**



**Figura 16.** Estratégia aplicada para a selecção de par de *primers* para o exão 16(2) do gene *TNNT2*. (A) Sequência do exão 16 do gene *TNNT2* (NM\_000364) (letras maiúsculas) e regiões intrónicas adjacentes (letras minúsculas) onde se pode visualizar o par de *primers* (negrito e sublinhado) para amplificação da região 16(2), produzindo um amplicão de 158pb. (B) Pico de desnaturação específico relativo ao amplicão referido em (A), sem evidência de erros experimentais, após optimização das condições reaccionais. (C) Comprovação de presença de produto de amplificação específico com 158pb em electroforese unidimensional em gel de agarose a 2% (marcador de pesos moleculares *HyperLadder IV*).

No caso dos pares de *primers* utilizados para amplificar o exão 9 do gene *TNNT2*, os exões 2 e 4 do gene *JPH2*, exões 3, 10 e 29 do gene *MYBPC3*, exão 2 do gene *TCAP* e exão 14 do gene *TTN* não se verificou qualquer tipo de amplificação, mesmo após sucessivos ajustes nas condições de PCR (resultados não apresentados), levando a crer que o seu desenho inicial não

seria o mais indicado e como tal procedeu-se a um novo desenho de *primers*. As novas hipóteses para a construção de *primers* para estas regiões genómicas encontram-se descritas no Apêndice II. Neste processo foi tido em especial atenção o tamanho dos amplicões que seriam obtidos. Idealmente, os amplicões produzidos devem rondar os 250pb pelo facto da variação de uma única base nucleotídica afectar mais o comportamento de desnaturação num amplicão de 100pb do que num amplicão superior a 500pb. Assim, amplicões menores são mais eficazes para detectar pequenas variações numa sequência genómica (Roche Diagnostics). Uma hipótese que poderá justificar esta situação de não amplificação será a possibilidade de existirem alterações na cadeia de DNA das amostras referência nos locais de ligação dos *primers*. Este facto poderá não só dificultar o seu emparelhamento, ou então, caso a sua localização seja imediatamente a seguir ao local de emparelhamento, poderá dificultar a acção da polimerase na extensão da nova cadeia. Saliente-se que na altura em que se desenharam os *primers* foram pesquisadas na base de dados HGMD as alterações de DNA subjacentes a estas regiões não tendo sido identificadas alterações. No entanto, tal não implica que não hajam polimorfismos ou mutações *de novo* para as sequências de DNA das amostras em estudo. Esta situação poderá ser relevante uma vez que muitos dos *primers* desenhados se encontram em regiões intrónicas, ricas em elementos repetitivos e polimorfismos (Figura 16A – *primer reverse*).

## **2. Rastreio de Mutações em Larga Escala por HRM**

Os 22 indivíduos em estudo foram rastreados para mutações em 62 regiões genómicas de 12 genes associados a MH: 10 genes sarcoméricos (*ACTC1*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2* e *TPM1*) e 2 genes do disco Z (*CSRP3* e *TCAP*). No total foram detectadas 41 alterações (Tabela 4). A maior parte das alterações detectadas encontram-se nos genes *MYH7* (15 alterações), *TNNT2* (9 alterações) e *MYBPC3* (8 alterações), indo de encontro com vários autores que referem estes genes como alguns dos principais responsáveis pelo desenvolvimento de MH (Tabela 4) (Alcalai *et al*, 2008; Richard *et al*, 2006; Ahmad *et al*, 2005; Bashyam *et al*, 2003). Foram detectadas 3 alterações de perfil no gene *ACTC1*, duas em cada um dos genes *TNNI3* e *CSRP3*, e uma alteração em cada um dos genes *MYH6* e *MYL2* (Tabela 4). Nos genes *MYL3*, *TNNC1*, *TPM1* e *TCAP* não foram detectadas quaisquer alterações (Tabela 4).

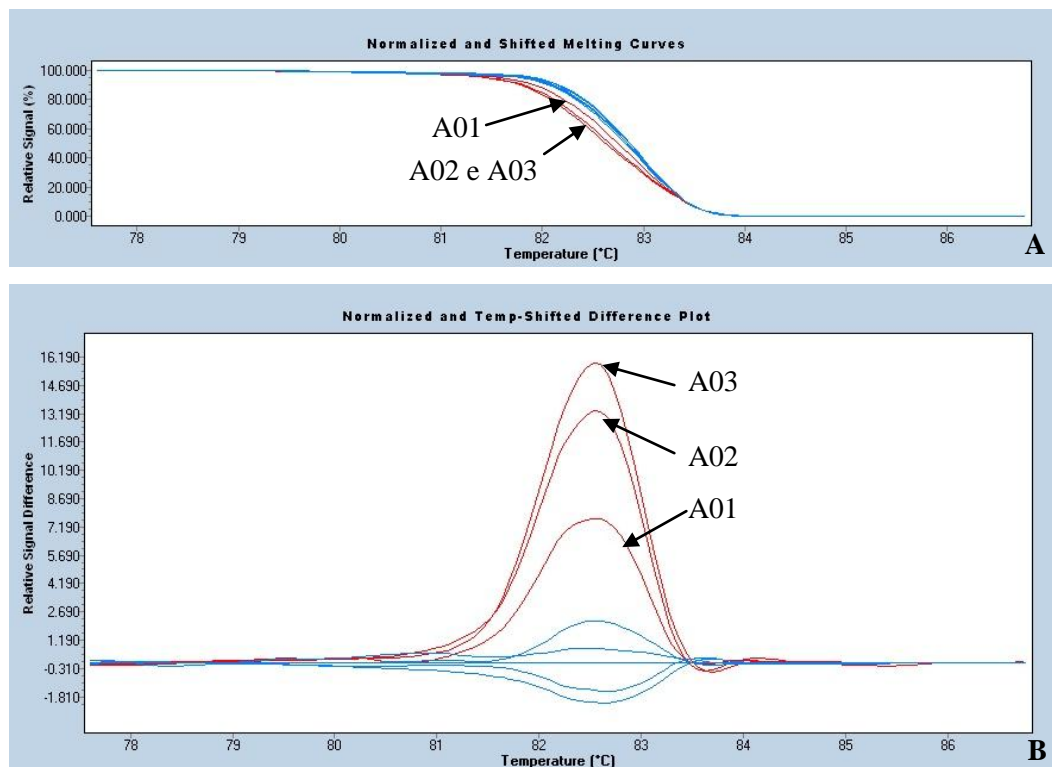
**Tabela 4.** Alterações detectadas por HRM nas amostras em estudo.

| Gene          | Número de Regiões<br>Genómicas<br>Optimizadas | Número de Regiões<br>Genómicas<br>Analisadas | Número de<br>Alterações<br>Detectadas |
|---------------|---|--|---------------------------------------|
| <i>ACTC1</i>  | 7   | 5  | 3                                     |
| <i>MYBPC3</i> | 27  | 17   | 8                                     |
| <i>MYH6</i>   | 8   | 1  | 1                                     |
| <i>MYH7</i>   | 34  | 16   | 15                                    |
| <i>MYL2</i>   | 7   | 2  | 1                                     |
| <i>MYL3</i>   | 5   | 3  | 0                                     |
| <i>TNNC1</i>  | 5   | 1  | 0                                     |
| <i>TNNI3</i>  | 5   | 3  | 2                                     |
| <i>TNNT2</i>  | 13  | 5  | 9                                     |
| <i>TPM1</i>   | 6   | 2  | 0                                     |
| <i>CSRP3</i>  | 9   | 6  | 2                                     |
| <i>TCAP</i>   | 1   | 1  | 0                                     |

### 2.1. Alterações no Gene *ACTC1*

Foram detectadas em HRM 3 alterações no DNA de três pacientes (A01, A02 e A03) no exão 6 do gene *ACTC1* (NM\_005159). Todos apresentavam um perfil de desnaturação diferente e valores de diferença relativa de sinal superiores a +5 (Figura 17).

Neste exão estão descritas duas mutações *missense* causadoras de MH (Ala297Ser e Met307Leu) e um SNP envolvendo uma substituição sinónima na Pro309 (HGMD, Ensembl Genome Browser - <http://www.ensembl.org/index.html>). Dada a natureza altamente conservada da actina e dado o seu papel crucial na contracção muscular, uma mutação envolvendo um domínio funcional chave desta proteína pode afectar a mecânica, a cinética e/ou a regulação da interacção actina-miosina (Debold *et al*, 2010). As substituições Ala295Ser e Met307Leu localizam-se perto dos resíduos envolvidos na interacção entre a actina e a miosina. Alterações destes a.a. provocam uma distorção da área envolvente conduzindo a uma má ligação da actina à miosina e assim a originando alterações na geração de força (Mogensen *et al*, 2004; Mogensen *et al*, 1999).

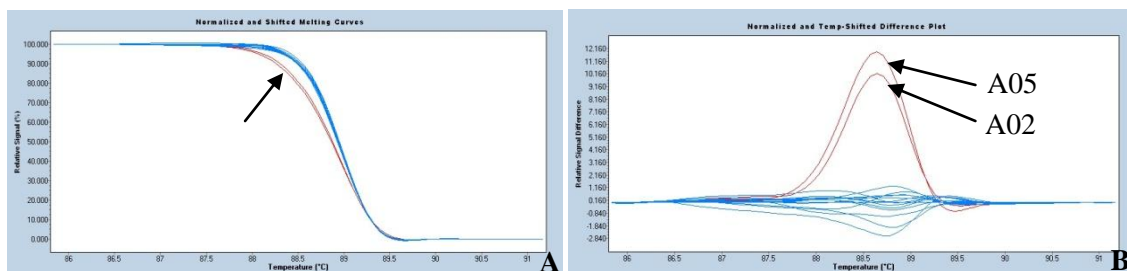


**Figura 17.** Alterações detectadas por HRM no exão 6 do gene *ACTC1*. (A) As curvas de desnaturação a vermelho são referentes às três amostras alteradas que apresentam um perfil distinto em relação às amostras de referência (controles) e restantes amostras (a azul). (B) O *difference plot* evidencia perfis distintos e diferenças de sinal relativas fora dos limites de normalidade: +5,6 para A01, +13,2 para A02 e, +16,2 para A03.

O DNA das três amostras alteradas encontram-se a aguardar os resultados de SA a fim de identificarem quais as alterações nucleotídicas que lhes são inerentes. Só assim se poderá chegar à conclusão se estamos presente a um polimorfismo comum a todas as amostras ou uma mutação que possa justificar o fenótipo de cada um dos indivíduos. Esta distinção será feita através de estudo populacional com pesquisa das eventuais alterações num grupo de 100 cromossomas. No entanto, tendo em conta o perfil semelhante para os 3 indivíduos e o número de indivíduos em causa poderemos muito bem, estar presente de um polimorfismo.

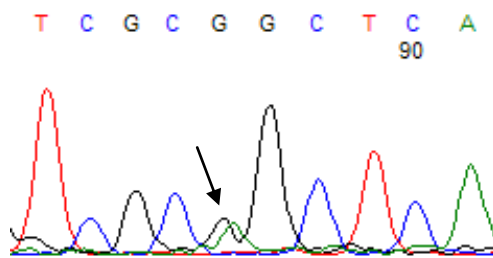
## 2.2. Alterações no Gene *CSRP3*

No exão 3 do gene *CSRP3* foram detectadas duas amostras com alteração: A02 e A05. Ambas apresentam uma curva de desnaturação tipicamente heterozigótica e o *difference plot* indica uma diferença relativa de sinal que ronda o valor de +11 (Figura 18).



**Figura 18.** Alterações detectadas em HRM no exão 3 do gene *CSRP3*. (A) As curvas de desnaturação de ambas as amostras apresentam um padrão de heterozigotia (seta preta). (B) O *difference plot* indica um valor de diferença relativa de sinal de +10,2 para o indivíduo A02 e de +12,2 para o indivíduo A05.

Após SA, foi identificada a substituição de uma base nucleotídica no codão 150 (NM\_003476) no indivíduo A05 (Figura 19). Esta alteração – c.150 G>A (p.Ala50Ala) – envolve a transição de uma guanina para uma adenina no terceiro nucleótido do codão GCG, resultando na conservação do a.a. codificado. Esta alteração não se encontra descrita como polimorfismo, passando assim a ser considerada como uma mutação silenciosa (Ensembl Genome Browser), não justificando assim as alterações fenotípicas observadas neste indivíduo.



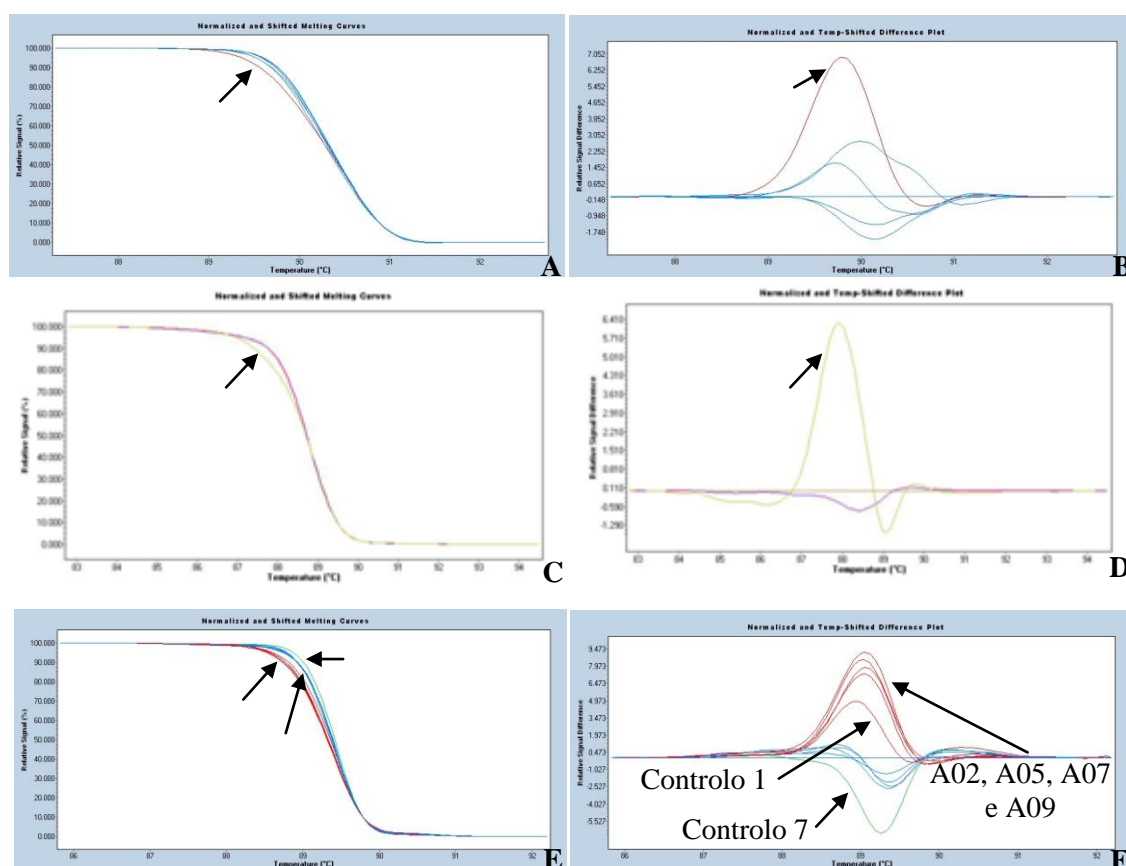
**Figura 19.** Cromatograma referente à mutação c.150 G>A (p.Ala50Ala) no gene *CSRP3* exão 3 no indivíduo A05. Pode-se observar a sobreposição do pico a preto referente a uma guanina com um pico verde referente a uma adenina (seta preta).

Contudo, na estratégia de diagnóstico de MH aplicada actualmente no nosso país, esta mutação, apesar de silenciosa, não seria detectada, dado o gene *CSRP3* não fazer parte do grupo de genes habitualmente estudados. Aguarda-se ainda o resultado da SA para o indivíduo A02, para se avaliar concretamente a alteração presente. Apesar do padrão da sua curva desnaturação ser muito semelhante ao da curva do indivíduo A05 e este facto ser um forte indicativo que poderemos estar presente a mesma alteração, não se pode afirmar com 100% de certeza que a alteração presente nos dois indivíduos seja a mesma. Neste exão encontram-se descritas cinco mutações *missense*, uma mutação *indel* e uma mutação em

*frameshift* causadoras de MH (HGMD). Para além destas mutações podem também existir cinco SNP, dois deles envolvendo alterações *missense* (Ensembl Genome Browser).

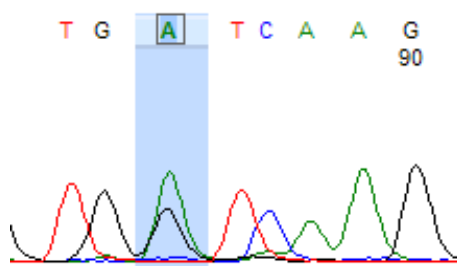
### 2.3. Alterações no Gene *MYBPC3*

No gene *MYBPC3* (NM\_000256) foram detectadas várias alterações. No indivíduo A03 foi detectada uma alteração no exão 5, no indivíduo MH002 detectou-se uma alteração no exão 7, e, no exão 28 foram detectadas alterações nos indivíduos A02, A05, A07, A09 e em dois controlos saudáveis (Figura 20). Todos os indivíduos apresentam curvas de desnaturação com perfil de heterozigotia e manifestam valores de diferença relativa de sinal entre -5 e +12 (Figura 20).



**Figura 20.** Alterações detectadas por HRM no gene *MYBPC3*. (A e B) Alteração no exão 5 para o indivíduo A03 que apresenta uma curva de desnaturação diferente das restantes amostras (seta a indicar a curva a vermelho) com uma diferença relativa de sinal de +7. (C e D) Alteração no exão 7 para o indivíduo MH002 que apresenta um perfil de desnaturação heterozigótico e distinto das restantes amostras (curva a verde assinalada com a seta) com uma diferença relativa de sinal de +6. (E e F) As curvas de desnaturação relativas à análise do exão 28 agrupam-se em 3 perfis diferentes identificados pelas setas e com diferenças relativas de sinal que variam entre -5,5 e +9,4.

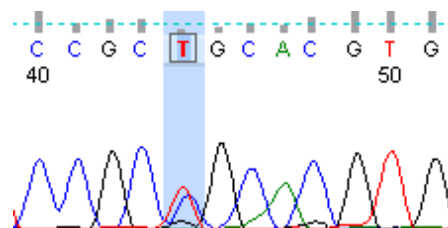
A SA do exão 5 do gene *MYBPC3* revelou no indivíduo A03 a presença de uma substituição *missense* c.565 G>A (p.Val189Ile), em heterozigotia (Figura 21). Esta alteração foi classificada anteriormente como um SNP (rs11570052) (Ensembl Genome Browser). Contudo, e apesar de esta alteração estar descrita como um SNP, tem uma frequência genotípica muito baixa (0,012) na população que o caracterizou (Ensemble Genome Browser - [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=rs11570052](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs11570052)) e não foi encontrada em mais nenhum dos nossos doentes de MH nem nos controlos (resultados não apresentados). No entanto, embora a sua presença possa não justificar as alterações fenotípicas do indivíduo em estudo, já que ambos os a.a. envolvidos, valina e isoleucina, são ambos a.a. apolares hidrofóbicos, não alterando a polaridade deste local na estrutura da proteína, só estudos mais específicos poderão esclarecer qual o efeito biológico desta alteração e se poderá ou não ser associada definitivamente ao fenótipo clínico deste doente. Estudos funcionais envolvendo esta alteração estão em curso no nosso laboratório.



**Figura 21.** Cromatograma referente ao polimorfismo c.565 G>A (p.Val189Ile) detectado no exão 5 do gene *MYBPC3* no indivíduo A03. A azul encontra-se destacada a sobreposição dos picos referentes à guanina e à adenina envolvidas nesta transição, a qual indica uma alteração em heterozigotia.

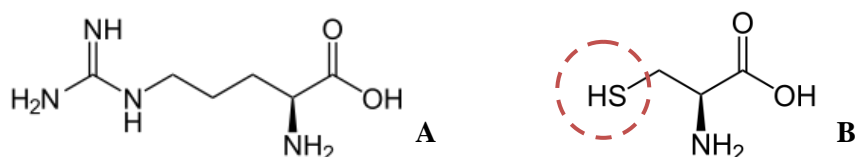
Já para o exão 7 foi identificada uma mutação nunca anteriormente descrita (HGMD, Figura 22) no indivíduo MH002. Esta mutação *missense* c.817 C>T (p.Arg273Cys), presente em heterozigotia, envolve a transição entre as duas bases pirimidínicas na posição 817 em que passa a existir na cadeia nucleotídica uma timina no lugar de uma citosina. Esta transição provoca uma alteração na sequência da proteína codificada em que o a.a. traduzido na posição 273 passa de uma arginina a uma cisteína.





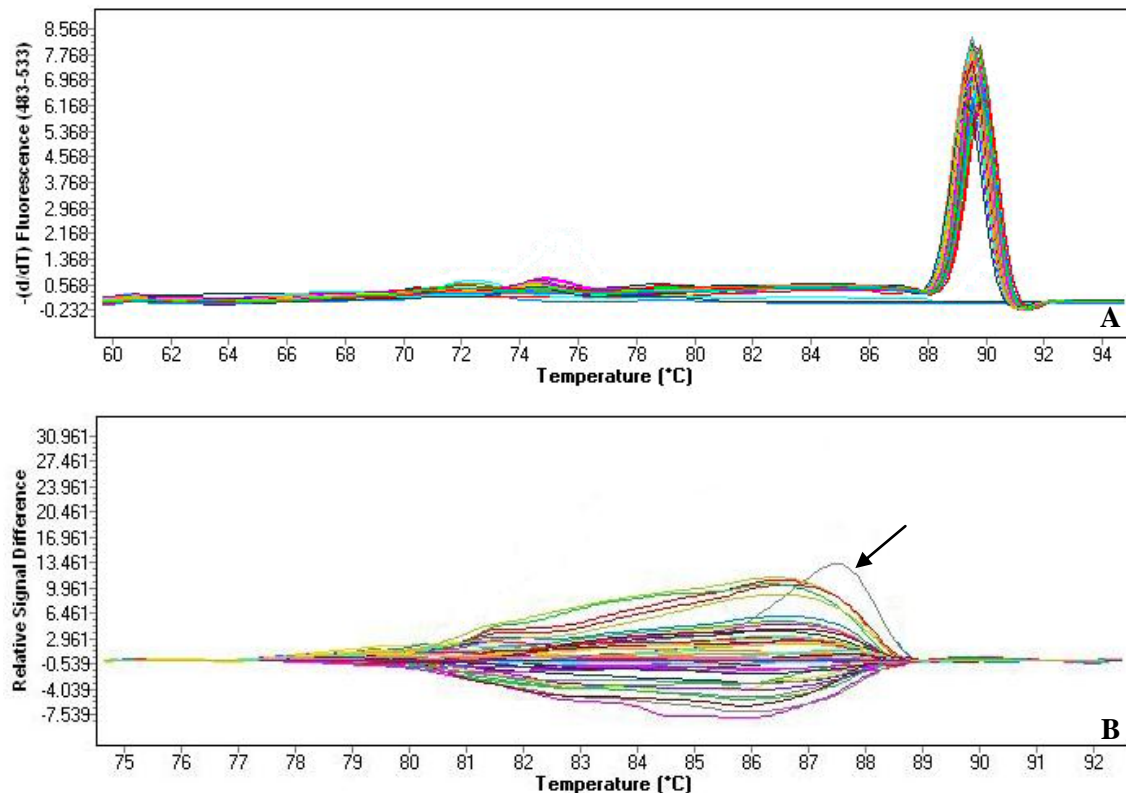
**Figura 22.** Cromatograma referente à mutação c.817 C>T (p.Arg273Cys) detectada no exão 7 do gene *MYBPC3* do doente MH002. Na zona assinalada a azul pode-se verificar a presença de dois picos sobrepostos, referentes a uma timina e a uma citosina, traduzindo uma alteração em heterozigotia.

Apesar de esta alteração ser nova, foi anteriormente associada a um fenótipo de MH num jovem de 16 anos, uma alteração neste codão (Arg273His) (Ingles *et al*, 2005). A substituição do a.a. polar básico, arginina, pelo a.a. polar neutro, cisteína, pode implicar alterações mais importantes na estrutura da proteína C de ligação à miosina relativamente à alteração da arginina por uma histidina, a.a. igualmente polar básico. A arginina tem preferencialmente uma carga positiva e tende a ligar-se a grupos carregados negativamente. A sua substituição por uma cisteína provoca a introdução de um grupo tiol com tendência à formação de pontes de dissulfureto (Figura 23). Este facto pode provocar a distorção local da proteína levando a uma fraca interacção proteína-proteína. Contudo, só estudos mais específicos podem esclarecer qual o efeito desta mutação na função da proteína C de ligação à miosina e o seu impacto no funcionamento do sarcómero.



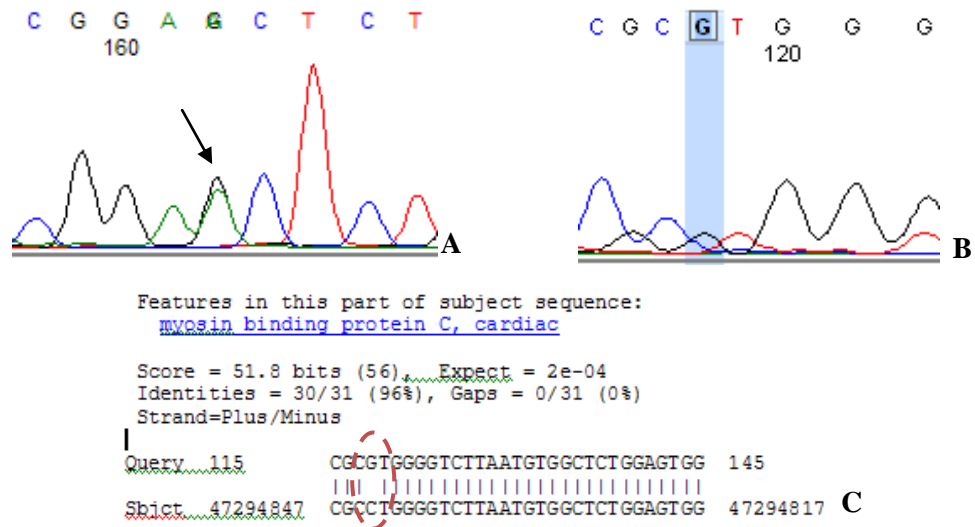
**Figura 23.** Estrutura molecular da arginina (A) e da cisteína (B). Encontra-se evidenciado o grupo tiol da cisteína, com a presença de um átomo de enxofre.

Esta alteração foi pesquisada em 100 cromossomas de 50 indivíduos saudáveis não tendo sido detectada (Santos *et al*, 2010; Figura 24). Deste modo, existem fortes indicativos que a mutação detectada por HRM no indivíduo MH002 será a causa das alterações fenotípicas características de MH nele identificadas.



**Figura 24.** Pesquisa em 50 indivíduos para a mutação c.817 C>T (p.Arg273Cys). (A) Picos de desnaturação referentes ao exão 7 do gene *MYBPC3* para os 50 indivíduos. (B) *Difference plot* correspondente onde se encontra evidenciado o perfil do indivíduo MH002 (seta preta).

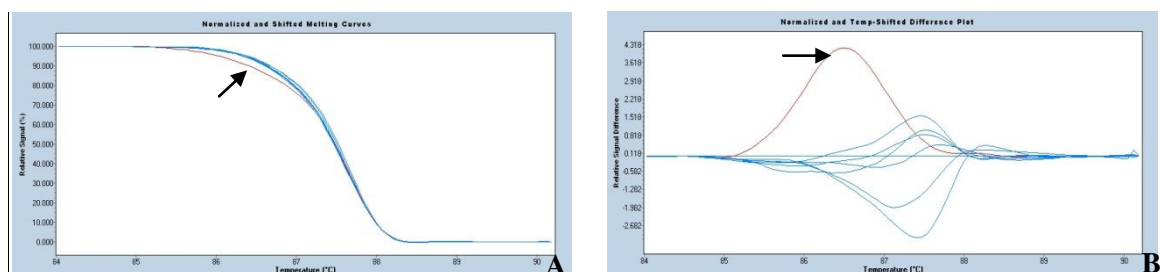
Quanto ao exão 28, onde foi detectado um maior número de alterações, foram até agora confirmadas por SA duas mutações silenciosas nos controles saudáveis: c.3285G>A(p.Glu1095Glu) no controle 1 e c.3288 C>G (p.Leu1096Leu) no controle 7 (Figura 25). Os diferentes padrões das curvas de desnaturação destas duas amostras controle relativamente às restantes amostras controle são assim justificados, já que as diferentes mudanças de nucleótido da cadeia genómica traduzem diferentes valores de  $T_m$  e assim diferentes comportamentos de desnaturação das cadeias (Figura 20 E e F). A natureza silenciosa da alteração não tem qualquer significado clínico para estas duas amostras. As restantes amostras, referentes ao DNA dos indivíduos A02, A05, A07 e A09, aguardam os resultados da SA a fim de se confirmar tratar-se ou não da mesma alteração presente no controle 1.



**Figura 25.** Cromatogramas referentes às alterações detectadas nos controlos. (A) Mutação em heterozigotia c.3285 G>A (p.Glu1095Glu) no controlo 1, com a sobreposição dos dois picos (seta preta). (B) Mutação em homozigotia c.3288 C>G (p.Leu1096Leu) detectada no controlo 7, com a presença de uma guanina no lugar de uma citosina assinalada a azul. (C) Alinhamento da sequência obtida a partir do cromatograma em B com a sequência normal do gene *MYBPC3* (NCBI, Blastn). Encontra-se assinalada a substituição de uma citosina por uma guanina patente no cromatograma em B.

## 2.4. Alterações no Gene *MYH6*

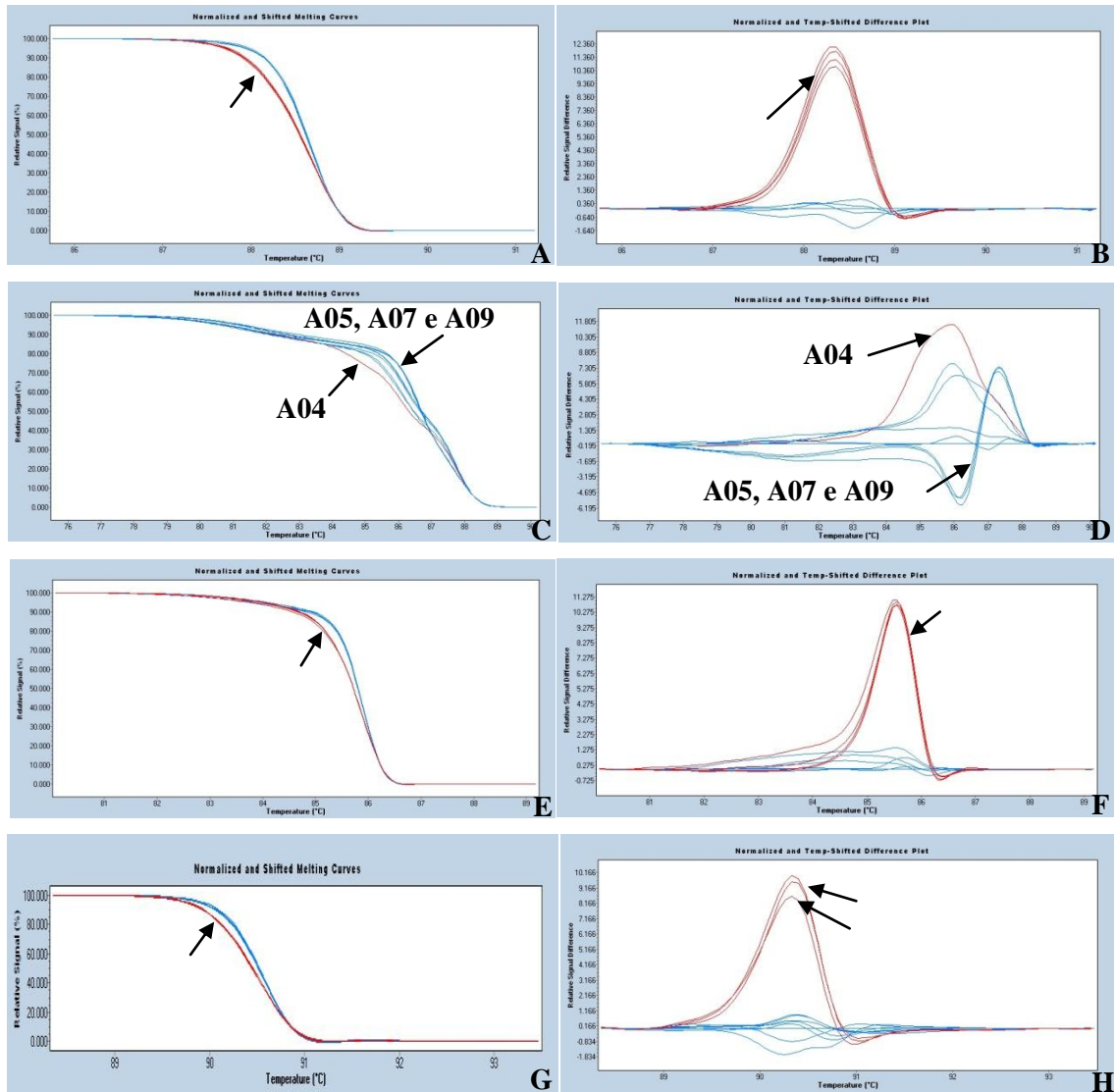
Foi detectada uma alteração no exão 3 do gene *MYH6* no indivíduo A05 (NM\_002471) (Figura 26). Neste gene estão descritas 13 mutações causadoras de MH, contudo nenhuma se encontra localizada neste exão (HGMD). Está também descrito um SNP neste exão envolvendo uma substituição não sinónima (Ensembl Genome Browser). Contudo, o DNA desta amostra encontra-se a aguardar os resultados de SA, após análise dos quais se poderá esclarecer qual a alteração na cadeia de DNA detectada por HRM.



**Figura 26.** Alteração detectada por HRM no gene *MYH6* exão 3. O indivíduo A05 apresenta uma curva de desnaturação com perfil distinto das restantes amostras (A) e uma diferença relativa de sinal de +4,3 (B). As curvas distintas encontram-se evidenciadas pelas setas a preto.

## 2.5. Alterações no Gene *MYH7*

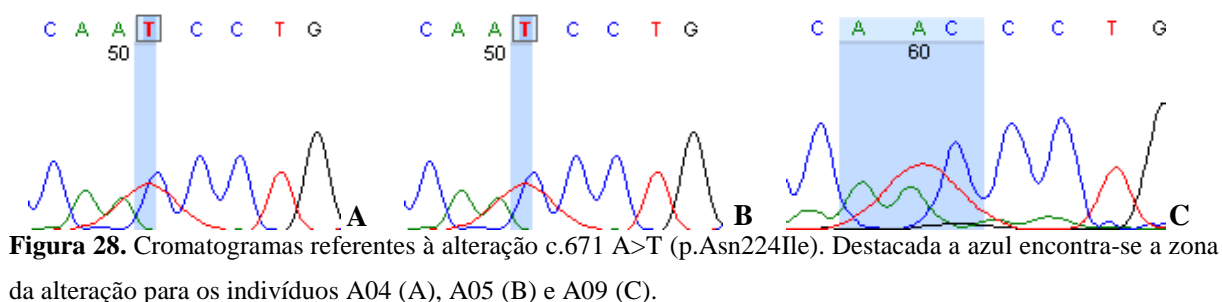
O gene *MYH7* foi aquele em que se detectou um maior número de alterações neste estudo – quinze no total. Foram detectadas quatro alterações no exão 8 e outras quatro alterações no exão 12 no que respeita aos indivíduos A04, A05, A07 e A09; três alterações no exão 24 nos indivíduos A07, A09 e A11 e ainda, quatro alterações no exão 38 envolvendo os indivíduos MH007, A04, A09 e A11 (NM\_000257.2) (Figura 27).



**Figura 27.** Alterações detectadas por HRM no gene *MYH7*, onde se evidencia por meio de setas pretas os diferentes padrões obtidos. (A e B) Alterações no exão 8 nos indivíduos A04, A05, A07 e A09 que apresentam curvas de desnaturação com um perfil heterozigótico, distinto em relação às restantes amostras e diferenças de sinal relativas entre +10 e +12. (C e D) Alterações no exão 12 para o indivíduo A04, e para os indivíduos A05, A07 e A09 que apresentam perfis de desnaturação distintos das restantes amostras. Também no *difference plot* se destacam agrupamentos diferenciados destas amostras. (E e F) Alterações no exão 24 para as amostras A07, A09 e A11 que apresentam um perfil de desnaturação heterozigótico e uma diferença relativa de sinal de +11. (G e H)

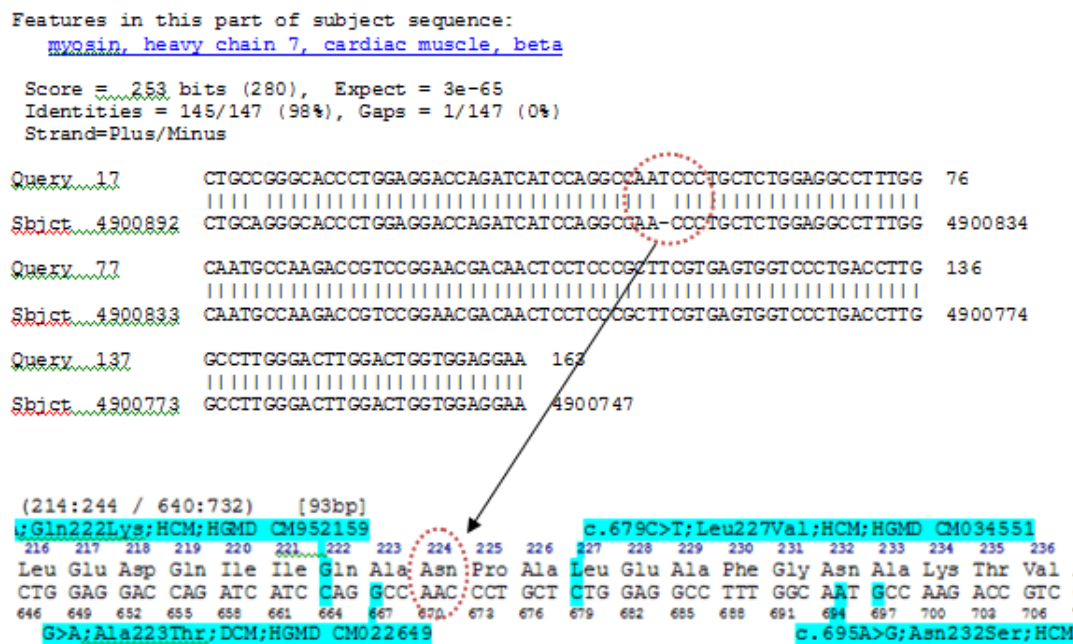
Alterações no exão 38 para os indivíduos MH007, A04, A09 e A11 que apresentam também um perfil de desnaturação com padrão de heterozigotia e diferenças de sinal relativas entre +8 e +10.

No exão 8 foi detectada por SA uma alteração em heterozigotia em três dos quatros indivíduos com perfil alterado: A04, A05 e A09 (Figura 28).

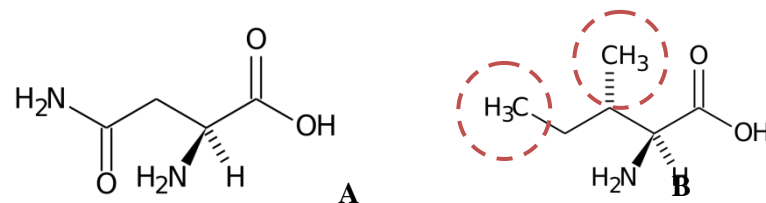


No entanto, por se constatar que esta reacção de sequenciação não estaria adequada devido à aparente ambiguidade do *software* de análise na interpretação do resultado em todas as amostras, estas foram reenviadas para SA e aguarda-se uma reconfirmação. O alinhamento das sequências obtidas com a sequência de referência para este gene sugere que se trate de uma alteração do nucleótido 671 que faz parte do codão Asn224 (Figura 29). A mutação detectada, c.671 A>T (p.Asn224Ile), parece assim envolver a transversão de uma adenina para uma timina no codão 224, implicando a mudança do a.a. polar neutro asparagina para o a.a. apolar isoleucina. Para além da alteração da polaridade local, a introdução dos dois grupos metilo da isoleucina pode distorcer a estrutura local da proteína codificada, conduzindo assim a um ineficiente funcionamento da miosina (Figura 30).

Caso a resequenciação apresente novamente indicações desta alteração no a.a. 224, serão analisados 100 cromossomas de 50 indivíduos saudáveis de forma a confirmar, se estaremos na presença de um polimorfismo, apesar de não estar descrito nenhum neste resíduo, ou na presença de uma mutação possivelmente associada ao fenótipo de MH nestes indivíduos (Ensembl Genome Browser). Mais uma vez, caso se confirme estarmos na presença de uma nova mutação, o efeito fisiológico causado por esta substituição de a.a. na cadeia pesada  $\beta$  da miosina e globalmente na MH deverá ser aprofundado com outros estudos moleculares. Para o indivíduo A07 aguarda-se ainda o resultado da SA, mas tendo por base o perfil obtido, semelhante aos dos indivíduos A04, A05 e A09, espera-se encontrar a mesma alteração, c.671A>T(p.Asn224Ile).

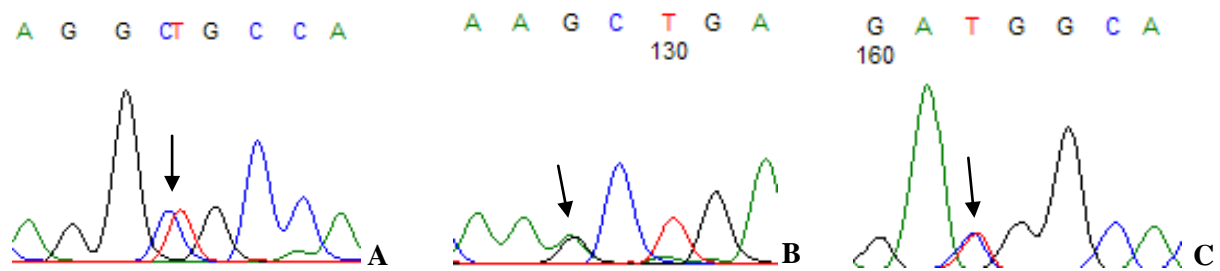


**Figura 29.** Alinhamento da sequência obtida a partir dos cromatogramas apresentados na figura 28 com a sequência normal do gene *MYH7* (NCBI, Blastn) e comparação com a grelha de leitura da proteína codificada. A presença de uma timina extra sem originar uma *frameshift* nos cromatogramas indica que não houve uma inserção mas que esta se encontra presente em heterozigotia com a adenina na posição 671.



**Figura 30.** Estruturas moleculares da asparagina (A) e isoleucina (B). Encontram-se destacados os grupos metilo característicos da isoleucina.

No exão 12 foram identificadas por SA três novas mutações silenciosas em heterozigotia: c.1062 C>T (p.Gly354Gly), c.1095 G>A (p.Lys365Lys) e c.1128 C>T (p.Asp376Asp) (Figura 31).



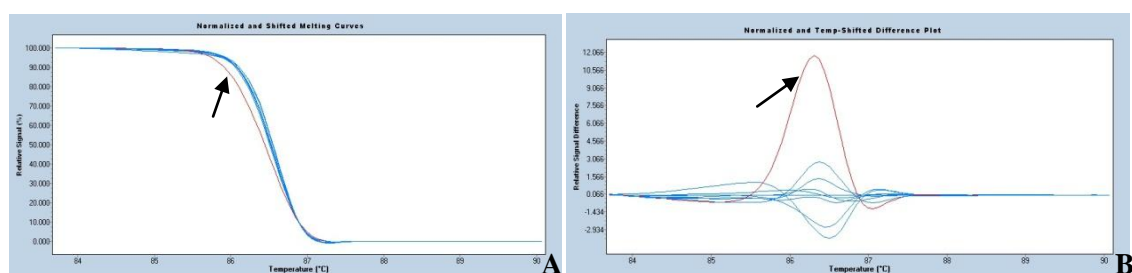
**Figura 31.** Cromatogramas referentes às mutações silenciosas identificadas no exão 12 do gene *MYH7*. As mutações em causa estão evidenciadas pela seta preta. (A) c.1062 C>T (p.Gly354Gly), (B) c.1095 G>A (p.Lys365Lys) e (C) c.1128 C>T (p.Asp376Asp).

Duas destas mutações silenciosas, c.1062 C>T (p.Gly354Gly) e c.1095 G>A (p.Lys365Lys), estavam presentes no DNA do mesmo indivíduo, A04, traduzindo uma situação de heterozigotia composta. O DNA dos outros três indivíduos (A05, A07 e A09) apresentam todos a mesma alteração - c.1128 C>T (p.Asp376Asp). Esta diferença entre as alterações justifica os diferentes comportamentos nos perfis apresentados do *difference plot* (Figura 27D). Estas alterações não justificam por si só fenótipo de MH nestes indivíduos, dado não envolverem qualquer alteração de a.a.

Quanto às alterações detectadas nos exões 24 e 38 (Figura 27E-H), aguarda-se o resultado da técnica de SA, para averiguar qual ou quais as alterações na sequência genómica responsáveis pela alteração dos perfis de desnaturação.

## 2.6. Alterações no Gene *MYL2*

No gene *MYL2* (NM\_000432) foi detectada uma alteração no exão 3 no indivíduo A09 (Figura 32). Contudo, ainda se aguarda os resultados de SA, sendo ainda desconhecida qual a alteração nucleotídica subjacente ao perfil de desnaturação distinto nesta amostra.



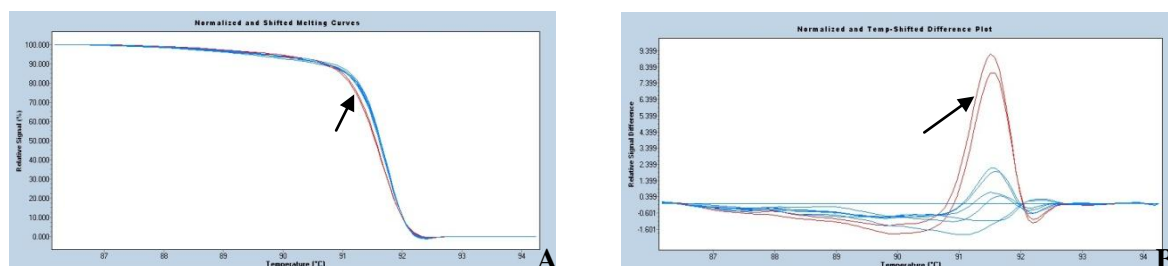
**Figura 32.** Alteração detectada por HRM no exão 3 do gene *MYL2* (setas pretas). O indivíduo A09 apresenta uma curva de desnaturação diferente das restantes amostras (A) e uma diferença relativa de sinal de +12 relativamente às restantes amostras (B).



Neste exão encontra-se descrita uma mutação *missense*, Asn47Lys, já descrita como causadora de MH num indivíduo holandês de 60 anos (Andersen *et al*, 2001). Encontram-se também descritos dois SNP em que um deles envolve uma alteração não sinónima provocando a substituição Gly57Arg (Ensembl Genome Browser).

## 2.7. Alterações no Gene *TNNI3*

Foram detectadas alterações no exão 1 de gene *TNNI3* (NM\_000363) nos indivíduos A02 e A05 (Figura 33). No entanto, a alteração ou alterações responsáveis pelos diferentes perfis de desnaturação não foram ainda identificadas, pois ainda se aguardam os resultados de SA. Nesta região genómica não se encontram descritos SNP nem mutações associadas a MH. No entanto, foi descrita uma mutação Ala2Val neste exão associada a um fenótipo de miocardiopatia dilatada (Murphy *et al*, 2004). Será interessante percebermos qual a alteração subjacente ao perfil distinto detectado por HRM para este doente, uma vez que em muitas situações a miocardiopatia dilatada surge associada a um estadio final em doentes de MH (Figura 1D; Assenza *et al*, 2009).

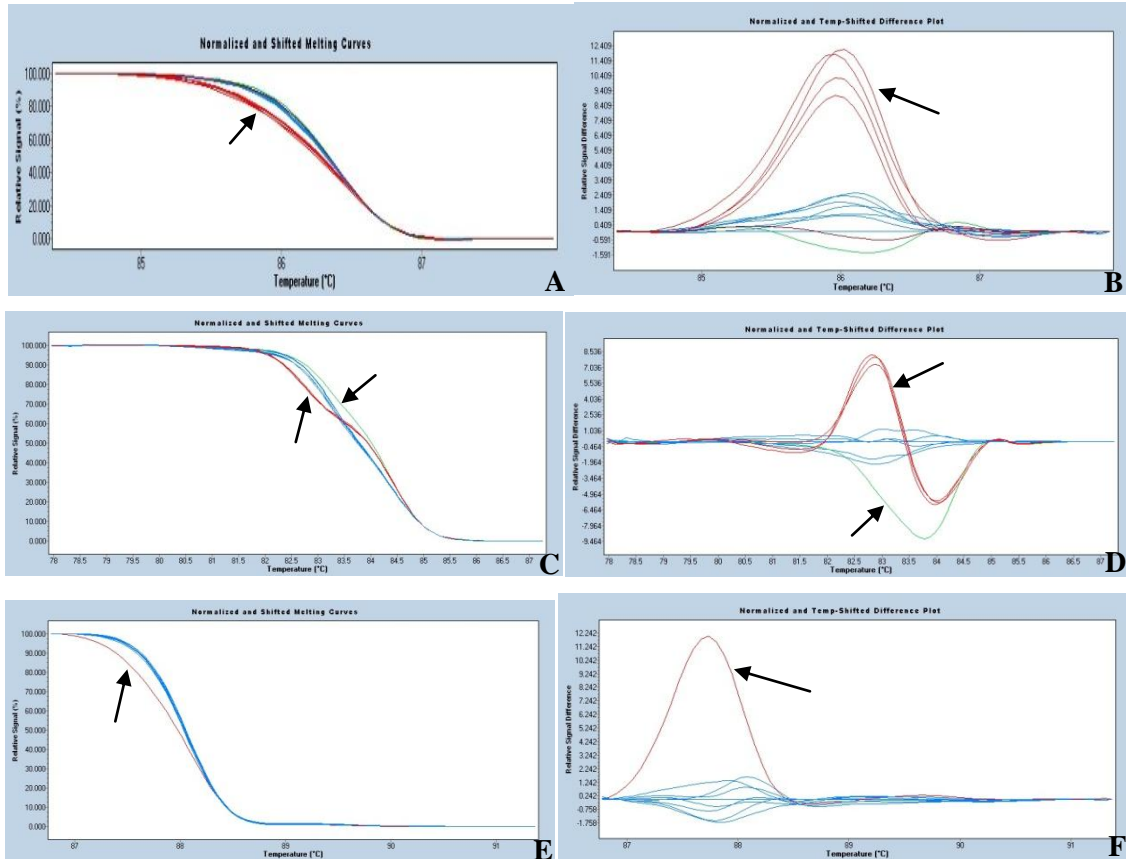


**Figura 33.** Alterações detectadas por HRM no exão 1 do gene *TNNI3* (setas pretas). Os indivíduos em causa apresentam curvas de desnaturação diferentes da normal (A) e valores de diferença relativa de sinal entre +8 e +9 (B).

## 2.8. Alterações no Gene *TNNT2*

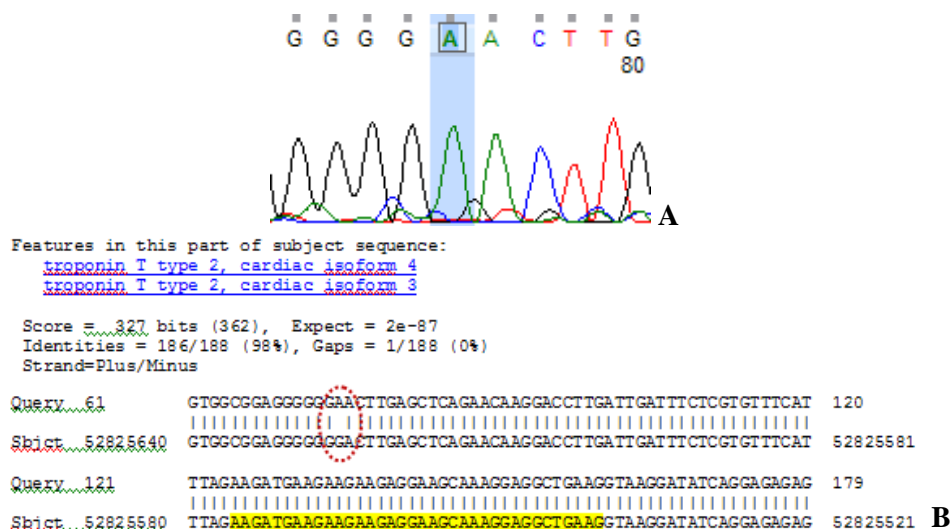
O gene *TNNT2* foi o segundo gene com mais alterações detectadas por HRM, com um total de nove alterações nos exões 3, 7 e 14 (NM\_000364) (Figura 34). No indivíduo MH008, a análise por HRM do exão 7 permitiu detectar uma substituição em homozigotia de uma guanina por uma adenina (Figura 35). No entanto, pela análise da localização desta alteração na sequência de DNA, constatou-se que esta se localizava no intrão 7 - designando-se por IVS7-50G>A.





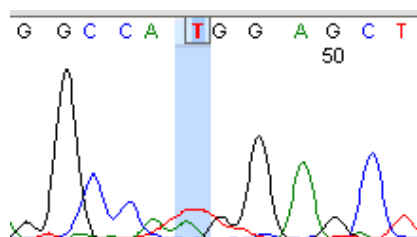
**Figure 34.** Alterações detectadas por HRM no gene *TNNT2* (setas a preto). (A e B) No exão 3, os indivíduos MH007, MH017, A09 e A11 apresentam curvas de desnaturação alteradas e diferenças de sinal relativas entre +8 e +12. (C e D) No exão 7, o indivíduo MH008, a verde, apresenta curva de desnaturação totalmente diferente tanto do normal como das outras amostras alteradas, A01, A07 e A11 e apresentam valores de diferença relativa de sinal de -9 para MH008 e entre -4 a +8 para as restantes. (E e F) No exão 14 apenas o indivíduo A02 apresenta alteração na curva de desnaturação com uma diferença relativa de sinal de +12.

A alteração atrás referida é suficiente para produzir um perfil de desnaturação distinto das restantes amostras, mas não estará possivelmente associado ao fenótipo de MH daquele doente, dado não afectar o *splicing* do intrão 7 e portanto, a sequência da proteína troponina T. Para as restantes amostras com alteração nesta região genómica aguarda-se ainda o resultado de SA.



**Figura 35.** Cromatograma e alinhamento de seqüências referentes à substituição no intrão 7. (A) No cromatograma encontra-se assinalado a azul o pico de adenina onde deveria existir uma guanina como demonstrado através do alinhamento da seqüência alterada com a seqüência normal. (B) Alinhamento da seqüência obtida do cromatograma observado em A) com a do NCBI para o gene *TNNT2*. No interior do círculo a tracejado vermelho identifica-se a alteração em causa e a amarelo encontra-se evidenciada a seqüência do exão 7.

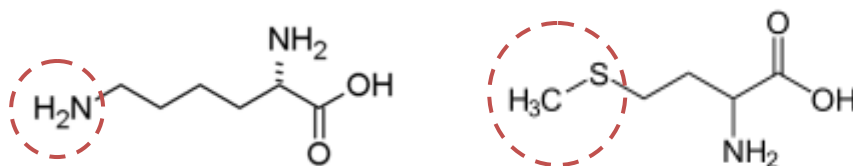
No exão 14, foi identificada uma mutação *missense* no indivíduo A02 nunca antes descrita (HGMD). A mutação c.722 A>T (p.Lys241Met), em heterozigotia, envolve a transversão de uma adenina para uma timina que acarreta uma mudança de a.a. (Figura 36). Embora não exista referência de mutações associadas a MH neste codão específico, a mudança de um a.a. polar altamente hidrofóbico como a lisina, para um a.a. apolar como a metionina, poderá provocar alterações na polaridade local da proteína e portanto na sua função.



**Figura 36.** Cromatograma referente à mutação c.722 A>T (p.Lys241Met). A azul evidencia-se o local onde surge o pico referente a uma timina sobreposto a um pico de adenina (normal).

Também o facto de deixar de existir o grupo amina da lisina passando a estar presentes o grupo metilo e um átomo de enxofre da metionina, pode provocar alterações na conformação local da troponina T (Figura 37). Mais, esta alteração ocorre numa região da proteína em que há interacção da troponina T com as outras troponinas do complexo e com a  $\alpha$ -tropomiosina

(Gomes *et al*, 2004). Estudos indicam que mutações nesta região da troponina T podem afectar a actividade da ATPase e a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  na geração de força (Gomes *et al*, 2004).



**Figura 37.** Estrutura molecular da lisina (A) e da metionina (B). O grupo amina da lisina na mutação c.722A>T(p.Lys241Met) é substituído pelo grupo metilo e pelo átomo de enxofre da metionina.

Deste modo, pode-se considerar que esta mutação poderá ser suficiente para causar as alterações fenotípicas deste indivíduo. Está em curso a análise de 100 cromossomas de 50 indivíduos saudáveis de forma a confirmar, se se trata de um polimorfismo ou de uma mutação possivelmente associada ao fenótipo de MH neste indivíduo. Mais uma vez, caso se confirme estarmos na presença de uma nova mutação, o efeito fisiológico causado por esta substituição de a.a. na troponina T deverá ser aprofundado com outros estudos moleculares.

As alterações detectadas no exão 3 encontram-se ainda a aguardar os resultados de SA.

Neste estudo foram assim confirmadas um total de 16 alterações em 10 indivíduos (Tabela 5). Apesar de ainda se aguardar os resultados da SA para um grande número das alterações detectadas por HRM, não se pode deixar de notar que até ao momento a taxa de falsos positivos obtida com a técnica de HRM é de 0%. Este facto só vem reforçar o imenso potencial da técnica de HRM na detecção de mutações e outras alterações anteriormente referido. Esta elevada sensibilidade na discriminação de alterações nucleotídicas levou à detecção de três novas mutações *missense* associadas a MH: c.722 A>T (p.Lys241Met) no gene *TNNT2*, c.671 A>T (p.Asn224Ile) no gene *MYH7* e c.817 C>T (p.Arg273Cys) no gene *MYBPC3*. Para além destas mutações, foram ainda identificadas seis variantes silenciosas, um SNP com baixa frequência populacional anteriormente descrito e de significado desconhecido e uma alteração intrónica.

**Tabela 5.** Alterações detectadas por HRM e confirmadas por SA.

| Amostra           | Gene          | Exão     | Alterações detectadas e confirmadas por SA | Tipo   |
|-------------------|---------------|----------|--|--|
| <b>Controlo 1</b> | <i>MYBPC3</i> | 28       | c.3285 G>A (p.Glu1095Glu)                  | Mutação silenciosa (MS)                      |
| <b>Controlo 7</b> | <i>MYBPC3</i> | 28       | c.3288 C>G (p.Leu1096Leu)                  | MS   |
| <b>A02</b>        | <i>TNNT2</i>  | 14       | c.722 A>T (p.Lys241Met)                    | Nova Mutação?                                |
| <b>A03</b>        | <i>MYBPC3</i> | 5        | c.565 G>A (p.Val189Ile)                    | SNP raro                                     |
| <b>A04</b>        | <i>MYH7</i>   | 8        | c.671 A>T (p.Asn224Ile)                    | Nova Mutação?                                |
|                   | <i>MYH7</i>   | 12       | c.1062 C>T (p.Gly354Gly)                   | MS   |
|                   | <i>MYH7</i>   | 12       | c.1095 G>A (p.Lys365Lys)                   | MS   |
| <b>A05</b>        | <i>CSRP3</i>  | 3        | c.150 G>A (p.Ala50Ala)                     | MS   |
|                   | <i>MYH7</i>   | 8        | c.671 A>T (p.Asn224Ile)                    | Nova Mutação?                                |
|                   | <i>MYH7</i>   | 12       | c.1128 C>T (p.Asp376Asp)                   | MS   |
| <b>A07</b>        | <i>MYH7</i>   | 8        | c.671 A>T (p.Asn224Ile) ?                  | Nova Mutação?                                |
|                   | <i>MYH7</i>   | 12       | c.1128 C>T (p.Asp376Asp)                   | MS   |
| <b>A09</b>        | <i>MYH7</i>   | 8        | c.671 A>T (p.Asn224Ile)                    | Nova Mutação?                                |
|                   | <i>MYH7</i>   | 12       | c.1128 C>T (p.Asp376Asp)                   | MS   |
| <b>MH002</b>      | <i>MYBPC3</i> | 7        | c.817 C>T (p.Arg273Cys)                    | Nova mutação<br>(Santos <i>et al</i> , 2010) |
| <b>MH008</b>      | <i>TNNT2</i>  | Intrão 7 | IVS7-50G>A                                 | SNP?   |

É interessante observar que a alteração c.671 A>T (p.Asn224Ile) no gene *MYH7*, caso realmente se venha a confirmar naqueles 4 doentes, A04, A05, A07 e A09, parece coexistir com a presença de mutações silenciosas no mesmo gene, nomeadamente c.1128C>T(p.Asp376Asp) nos doentes A5, A7 e A9, e com c.1062 C>T (p.Gly354Gly) e c.1095 G>A (p.Lys365Lys) no doente A04. O facto desta alteração c.671 A>T (p.Asn224Ile) se encontrar num grupo restrito de atletas de alta competição é só por si um facto interessante, estando de momento em curso a pesquisa destas alterações numa amostra de 150 indivíduos com MH. Estes 150 indivíduos incluem um grupo de atletas de alta competição em maior número do que o estudado neste trabalho. Como controlo, pretende-se ainda incluir um grupo de atletas de alta competição saudáveis sem história familiar positiva de MH e sem manifestação clínica e ecocardiográfica de MH. Este tipo de análise mais minuciosa permitirá concluir se estamos perante um polimorfismo ou uma mutação associada a MH e se esta alteração se restringue a este tipo de população – atletas de alta competição. Seria interessante poder correlacionar estas alterações, presentes nestes indivíduos, com a prática do desporto

profissional. Concretamente, pode-se inferir se a alteração genética detectada advém de uma resposta fisiológica adaptativa (que poderá ou não ser patológica) ou se por sua vez se for parte integrante da genómica destes indivíduos lhes permite uma adaptação à prática desportiva intensa.

Recentemente um grupo de investigação francês publicou um trabalho em que desenvolve uma estratégia de diagnóstico genético de MH utilizando a técnica de HRM semelhante à apresentada neste trabalho (Millat *et al*, 2010). Contudo, o trabalho de Santos e colaboradores, apesar de ainda não estar disponível *on-line* (foi aceite para publicação no presente mês de Setembro), foi submetido para publicação em data anterior e envolve a análise de um número muito superior de genes associados a MH (Santos *et al*, 2010). Tendo limitado a sua investigação aos genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *TNNI3* e, partindo de um grupo de indivíduos anteriormente estudados por dHPLC e SA, Millat e colaboradores demonstram, tal como Santos *et al* (2010) e o presente trabalho, o potencial da aplicação da técnica de HRM ao diagnóstico genético de MH (Millat *et al*, 2010; Santos *et al*, 2010). Em ambos os grupos de investigação, a detecção de qualquer tipo de alteração foi extremamente eficaz e a necessidade de aplicar a técnica de SA foi drasticamente reduzida. A técnica de HRM pode assim ser considerada uma excelente estratégia de diagnóstico de patologias complexas como a MH, a qual envolve um elevado número de genes na sua patogénese.

#### IV. Conclusão e Perspectivas Futuras

O principal objectivo deste trabalho prendeu-se com a validação da técnica de HRM, uma plataforma para detecção de mutações e outras alterações com aplicação em larga escala, em associação ao diagnóstico genético de MH. Para tal foram testados 195 pares de *primers* relativos a 24 genes já associados a MH, dos quais foram validados cerca de 75%. A consequente aplicação desta metodologia ao diagnóstico genético de MH num grupo de 22 pacientes permitiu a detecção de três novas mutações *missense* muito possivelmente associadas a MH: c.722 A>T (p.Lys241Met) no gene *TNNT2*, c.671 A>T (p.Asn224Ile) no gene *MYH7* e c.817 C>T (p.Arg273Cys) no gene *MYBPC3*. Para além destas mutações, foram ainda identificadas seis variantes silenciosas, um SNP anteriormente descrito de significado desconhecido e uma alteração intrónica. A taxa de falsos positivos com base nos resultados até agora validados por sequenciação foi de 0%. Deste modo, a aplicação da técnica de HRM diminuiu drasticamente a necessidade de SA, diminuindo os custos para o paciente, tempo de espera dos resultados, demonstrando ser uma estratégia de diagnóstico rápida e eficiente. Em contraste com a SA, a técnica de HRM irá facilitar o estudo de um muito maior número de genes permitindo um *screening* mais minucioso do que com a estratégia de diagnóstico usada actualmente. A análise dos nossos resultados, até ao presente momento, parece concordar com outros estudos em que os genes principalmente envolvidos nesta patologia são o *MYH7*, *MYBPC3* e *TNNT2*, mas atendendo ao número limitado de doentes estudado neste trabalho, ainda muito há a fazer para se conhecer a base epidemiológica da MH no nosso país.

Pretende-se no futuro concluir a optimização da técnica de HRM, extendendo-a a ainda mais genes associados a MH e a um maior número de pacientes com MH. Esta optimização permitirá a análise rápida e cuidada de um maior número de pacientes. Esperam-se os resultados pendentes das SA a fim de identificar inequivocamente quais as alterações subjacentes aos perfis de desnaturação distintos obtidos para os genes *ACTC1*, *CSRP3*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *TNNI3* e *TNNT2*. Irão ser concluídos os estudos populacionais de modo a atestar se as mutações *missense* encontradas nos genes *MYH7* e *TNNT2* são de facto mutações ou polimorfismos. Após esta análise será interessante estudar qual o efeito biológico destas novas alterações/mutações identificadas e qual a sua influência no desenvolvimento de um fenótipo clínico de MH, e em particular na sub-população de atletas de alta competição. Ensaio a este nível foram já iniciados pelo grupo de investigação onde se insere esta dissertação. Para verificar os efeitos causados na conformação proteica a nível da estequiometria do sarcómero podem ser aplicados modelos bio-informáticos de

modulação proteica. Já para avaliar a influência das alterações na função da proteína, podem ser utilizados vários modelos como levedura, peixe-zebra ou células animais, nomeadamente cardiomiócitos, e aplicados vários tipos de ensaios funcionais de interação proteica como o *yeast two-hybrid* ou *MAPPIT*. A aplicação de técnicas como o HRM no estudo de doenças complexas que envolvem um elevado número de genes como a MH demonstra assim trazer imensas vantagens. Com uma aplicação pouco dispendiosa aliada a uma rápida execução, e com uma elevada sensibilidade, o HRM permite detectar qualquer variação no DNA dos pacientes. Estes podem assim passar a usufruir de um diagnóstico genético mais completo e mais rápido dado se poder passar a analisar um mais elevado número de genes num curto espaço de tempo. Este *screening* mais minucioso nos genes associados a MH permitirá também aumentar a panorâmica de mutações causadoras de fenótipo possibilitando à comunidade médica e científica a associação de fenótipos e a aplicação de terapêuticas individuais e especializadas. Com todos estes dados, pretende-se colaborar para um futuro estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo, de forma a melhorar o diagnóstico e prognóstico da MH em Portugal, e em outras partes do Mundo.

## V. Bibliografia

- Ahmad, F., Seidman, J.G., Seidman, C.E. 2005. The genetic basis for cardiac remodeling. *Annual Reviews of Genomics and Human Genetics* 6: 185-216.
- Alcalai, R., Seidman, J.G., Seidman, C.E. 2008. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 19: 104-110.
- Alders, M., Jongbloed, R., Deelen, W., van den Wijngaard, A., Doevendans, P., Cate, F.T., Regitz-Zagrosek, V., Vosberg, H., van Langen, I., Wilde, A., Dooijes, D., Mann, M. 2003. The 2373insG mutation in the *MYBPC3* gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *European Heart Journal* 24: 1848-1853.
- Alpert, N.R., Mohiddin, S.A., Tripodi, D., Jacobson-Hatzell, J., Vaughn-Whitley, K., Brosseau, C., Warshaw, D.M., Fananapazir, L. 2005. Molecular and phenotypic effects of heterozygous, homozygous, and compound heterozygote myosin heavy-chain mutations. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 288: H1097-H1102.
- Andersen, P.S., Havndrup, O., Hougs, L., Sorensen, K.M., Jensen, M., Larsen, L.A., Hedley, P., Thomsen, A.R.B., Moolman-Smook, J., Christiansen, M., Bundgaard, H. 2009. Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. *Human Mutation* 30(3): 363-370.
- Andersen, P.A., Havndrup, O., Bundgaard, H., Moolman-Smook, J.C., Larsen, L.A., Mogensen, J., Brink, P.A., Børghlum, A.D., Corfield, V.A., Kjeldsen, K., Vuust, J., Christiansen, M. 2001. Myosin light chain mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy: phenotypic presentation and frequency in Danish and South African populations. *Journal of Medical Genetics* 38: e43.
- Antonicka, H., Mattman, A., Carlson, C.G., Glerum, D.M., Hoffbuhr, K.C., Leary, S.C., Kennaway, N.G., Shoubbridge, E.A. 2003. Mutations in *COX15* produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Human Genetics* 72: 101-114.
- Arimura, T., Bos, J.M., Sato, A., Kubo, T., Okamoto, H., Nishi, H., Harada, H., Koga, Y., Moulik, M., Doi, Y.L., Towbin, J.A., Ackerman, M.J., Kimura, A. 2009. Cardiac ankyrin



repeat protein gene (*ANKRD1*) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 54(4): 334-342.

- Arimura, T., Matsumoto, Y., Okazaki, O., Hayashi, T., Takahashi, M., Inagaki, N., Hinohara, K., Ashizawa, N., Yano, K., Kimura, A. 2007. Structural analysis of obscurin gene in hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362: 281–287.
- Assenza, G. E., Spirito, P., Musumeci, M.B., Lombardi, M., Quarta, G., Autore, C. 2009. Severe left ventricular wall thinning and extensive fibrosis without evolution to end stage disease in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American Society of Echocardiography* 22: 1196.e1-1196.e2.
- Audrezet, M.P., Dabricot, A., Le Marechal, C., Ferec, C., 2008. Technical advance validation of high resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. *Journal of Molecular Diagnostics* 10(5): 424-434.
- Basavarajaiah, S., Saha, A., Sharma, S. 2007. Sudden cardiac death in young athletes. *Heart* 93: 287-289.
- Bashyam, M.D., Savithri, G.R., Kumar, M.S., Narasimham, C., Nallari, P. 2003. Molecular genetics of familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC). *Journal of Human Genetics* 48: 55-64.
- Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B., Schwartz, K. 1998. Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circulation Research* 83: 580-593.
- Bos, J.M., Ackerman, M.J. 2010. Z-Disc genes in hypertrophic cardiomyopathy - Stretching the cardiomyopathies? *Journal of the American College of Cardiology* 55(11): 1136-1138.
- Bos, J.M., Poley, R.N., Ny, M., Tester, D.J., Xu, X., Vatta, M., Towbin, J.A., Gersh, B.J., Ommen, S.R., Ackerman, M.J. 2006. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Molecular Genetics and Metabolism* 88: 78-85.
- Carniel, E., Taylor, M.R.G., Sinagra, G., Lenarda, A.D., Ku, L., Fain, P.R., Boucek, M.M., Cavanaugh, J., Miocic, S., Slavov, D., Graw, S.L., Feiger, J., Zhu, X.Z., Dao, D., Ferguson, D.A., Bristow, M.R., Mestroni, L. 2005.  $\alpha$ -Myosin heavy chain. A sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulation* 112: 54-59.

- Chiu, C., Bagnall, R.D., Ingles, J., Yeates, L., Kennerson, M., Donald, J.A., Jormakka, M., Lind, J.M., Semsarian, C. 2010. Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 55(11): 1127-1135.
- Chiu, C., Tebo, M., Ingles, J., Yeates, L., Arthur, J.W., Lind, J.M., Semsarian, C. 2007. Genetic screening of calcium regulation genes in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 43: 337–343.
- CGC Centro de Genética Clínica. Lista de análises. Versão de Setembro de 2010. <http://www.cgccgenetics.com/textos/?imr=2&imc=120n> in CGC <http://www.cgccgenetics.com/>.
- Corrado, D., Pelliccia, A., Björnstad, H.H., Vanhees, L., Biffi, A., Borjesson, M., Panhuyzen-Goedkoop, N., Deligiannis, A., Solberg, E., Dugmore, D., Mellwig, K.P., Assanelli, D., Delise, P., van-Buuren, F., Anastasakis, A., Heidbuchel, H., Hoffmann, E., Fagard, R., Priori, S.G., Basso, C., Arbustini, E., Blomstrom-Lundqvist, C., McKenna, W.J., Thiene, G. 2005. Cardiovascular preparticipation screening of young competitive athletes for prevention of sudden death: proposal for a common European protocol: consensus statement of the Study Group of Sport Cardiology of the Working Group of Myocardial and Pericardial Diseases of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 26: 516 –524.
- D’Amico, A., Graziano, C., Pacileo, G., Petrini, S., Nowak, K.J., Boldrini, R., Jacques, A., Feng, J., Porfiro, B., Sewry, C.A., Santorelli, F.M., Limongelli, G., Bertini, E., Laing, N., Marston, S.B. 2006. Fatal hypertrophic cardiomyopathy and nemaline myopathy associated with *ACTA1* K336E mutation. *Neuromuscular Disorders* 16: 548-552.
- Davis, J.S., Hassanzadeh, S., Winitsky, S., Lin, H., Satorius, C., Vemuri, R., Aletras, H.A., Wen, H., Epstein, N. 2001. The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. *Cell* 107: 631-641.
- Debold, E., Saber, W., Cheema, Y., Bookwalter, C.S., Trybus, K.M., Warshaw, D.M., VanBuren, P. 2010. Human actin mutations associated with hypertrophic and dilated cardiomyopathies demonstrate distinct thin filament regulatory properties in vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48: 286-292.
- Dhandapany, P.S., Sadayappan, S., Xue, Y., Powell, G.T., Rani, D.S., Nallari, P., Rai, T.S., Khullar, M., Soares, P., Bahl, A., Tharkan, J.M., Vaideeswar, P., Rathinavel, A., Narasimhan, C., Ayapati, D.R., Ayub, Q., Mehdi, S.Q., Oppenheimer, S., Richards, M.B., Price, A.L., Patterson, N., Reich, D., Singh, L., Tyler-Smith, C., Thangaraj, K. 2009. A common *MYBPC3* (cardiac myosin binding protein C) variant associated with cardiomyopathies in South Asia. *Nature Genetics* 41(2): 187-191.

- D.N. Cooper, E.V. Ball, P.D. Stenson, A.D. Phillips, K. Howells, M.E. Mort, N.S.T. Thomas. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Versão de Setembro de 2010. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
- Dobrowolski, S., Ellingson, C., Coyne, T., Grey, J., Martin, R., Naylor, E., Koch, R., Levy, H. 2007. Mutations in the phenylalanine hydroxylase gene identified in 95 patients with phenylketonuria using novel systems of mutation scanning and specific genotyping based upon thermal melt profiles. *Molecular Genetics and Metabolism* 91: 218-227.
- EMBL-EBI e Wellcome Trust Sanger Institute. Ensembl Genome Browser. <http://www.ensembl.org/index.html>.
- Fatkin, D., Graham, R.M. 2002. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiological Reviews* 82: 945-980.
- Gazzerri, E., Sotgia, F., Bruno, C., Lisanti, M.P., Minetti, C. 2010. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *European Journal of Human Genetics* 18: 137–145.
- Geier, C., Gehmlich, K., Ehler, E., Hassfeld, S., Perrot, A., Hayess, K., Cardim, N., Wenzel, K., Erdmann, B., Krackhardt, F., Posch, M.G., Bublak, A., Nägele, H., Scheffold, T., Dietz, R., Chien, K.R., Spuler, S., Fürst, D.O., Nürnberg, P., Özcelik, C. 2008. Beyond the sarcomere: *CSRP3* mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 17(18): 2753-2765.
- Genetest. Testes Genéticos: Miocardiopatia Hipertrófica. Versão de Setembro de 2010. <http://www.genetest.pt/index.php?id=4&testid=2> in <http://www.genetest.pt/>.
- Genomed Diagnósticos de Medicina Molecular. Testes por Unidade: Unidade de Doenças Genéticas e Farmacogenómica. Versão de Setembro de 2010. [http://www.genomed.pt/2por\\_unid.php](http://www.genomed.pt/2por_unid.php) in <http://www.genomed.pt/>.
- Gidlöf, O., Burvall, S., Edvinson, L., Montelius, M., Allen, M., Molin, M. 2009. Complete discrimination of six individuals based on high-resolution melting of hypervariable regions I and II of the mitochondrial genome. *BioTechniques* 47: 671-678.
- Girolami, F., Ho, C.Y., Semsarian, C., Baldi, M., Will, M.L., Baldini, K., Torricelli, F., Yeates, L., Cecchi, F., Ackerman, M.J., Olivetto, I. 2010. Clinical features and outcome of hypertrophic myocardiopathy associated with triple sarcómero protein gene mutations. *Journal of the American College of Cardiology* 55(14): 1444-1453.
- Granzier, H.L., Labeit, S. 2004. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling and disease. *Circulation Research* 94: 284-295.

- Greenberg, M.J., Watt, J.D., Jones, M., Kazmierczak, K., Szczesna-Cordary, D., Moore, J.R. 2009. Regulatory light chain mutations associated with cardiomyopathy affect myosin mechanics and kinetics. *Journal of Molecular and cellular Cardiology* 46(1): 108-115.
- Gomes, A.V., Barnes, J.A., Harada, K., Potter, J.D. 2004. Role of troponin T in disease. *Molecular and Cellular Biochemistry* 263: 115-129.
- Gomes, A.V., Potter, J.D. 2004. Molecular and cellular aspects of troponin cardiomyopathies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1015: 214-224.
- Harada, K., Morimoto, S. 2004 Inherited cardiomyopathies as a Troponin Disease. *Japanese Journal of Physiology* 54: 307-318.
- Hayashi, T., Arimura, T., Itoh-Satoh, M., Ueda, K., Hohda, S., Inagaki, N., Takahashi, M., Hori, H., Yasunami, M., Nishi, H., Koga, Y., Nakamura, H., Matsuzaki, M., Choi, B.Y., Won Bae, S., Woon You, C., Hoon Han, K., Park, J.E., Knöll, R., Hoshijima, M., Chien, K.R., Kimura, A. 2004. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 44(11): 2192-2201.
- Hernandez, O.M., Jones, M., Guzman, G., Szczesna-Cordary, D. 2007. Myosin essential light chain in health and disease. *Heart and Circulatory Physiology* 292: H1643-H1654.
- Hershberger, R., Lindenfield, J., Mestroni, L., Seidman, C.E., Taylor, M., Towbin, J. 2009. Genetic evaluation of cardiomyopathy - A heart failure society of America practice guideline. *Journal of Cardiac Failure* 15: 83-97.
- Ho, C. 2010. Hypertrophic cardiomyopathy. *Heart Failure Clinic* 6: 141-159.
- Hoffman, B., Schmidt-Traub, H., Perrot, A., Osterziel, K.J., Gesner, R. 2001. First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Human Mutation* 17(6): 524.
- Hughes, S.E., McKenna, W.J. 2005. New insights into the pathology of inherited cardiomyopathy. *Heart* 91: 257-264.
- Ingles, J., Doolan, A., Chiu, C., Seidman, J., Seidman, C., Semsarian, C. 2005. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counseling. *Journal of Medical Genetics* 42: e59.
- International Olympic Committee Medical Commission. 2004. Sudden Cardiovascular Death in Sport: Lausanne Recommendations: Preparticipation Cardiovascular Screening. Version 29 June 2010. [http://multimedia.olympic.org/pdf/en\\_report\\_886.pdf](http://multimedia.olympic.org/pdf/en_report_886.pdf).

- Jongbloed, R.J., Marcelis, C.L., Doevendans, P.A., Schmeitz-Mulkens, J.M., Van Dockum, W.G., Geraedts, J.P., Smeets, H.J. 2003. Variable clinical manifestation of a novel missense mutation in the alpha-tropomyosin (*TPMI*) gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 41(6): 981–986.
- Keller, D., Carrier, L., Schwartz, K. 2002. Genetics of familial cardiomyopathies and arrhythmias. *Swiss Medical Weekly* 132: 401-407.
- Kelly, M., e Semsarian, C. 2009. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease. A marker of disease severity? *Circulation: Cardiovascular Genetics* 2: 182-190.
- Kelly, B.S., Mattu, A., Brady, W. J. 2007. Hypertrophic cardiomyopathy: electrocardiographic manifestations and other important considerations for the emergency physician. *American Journal of Emergency Medicine* 25: 72-79.
- Konno, T., Shimizu, M., Ino, H., Fujino, N., Uchiyama, K., Mabuchi, T., Sakata, K., Kaneda, T., Fujita, T., Masuta, E., Mabuchi, H. 2006. A novel mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene is responsible for hypertrophic cardiomyopathy with severe ventricular hypertrophy and sudden death. *Clinical Science* 1(10): 125-131.
- Krenková, P., Norambuena, P.A., Stambergová, A., Macek, M. 2009. Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the *CFTR* gene. *Folia Biologica (Praha)* 55: 238-242.
- Landstrom, A.P., Parvatiyar, M.S., Pinto, J.R., Marquardt, M.L., Bos, M.J., Tester, D.J., Ommen, S.R., Potter, J.D., Ackerman, M.J. 2008. Molecular and functional characterization of novel hypertrophic cardiomyopathy susceptibility mutations in *TNNC1*-encoded troponin C. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45: 281-288.
- Landstrom, A.P., Weisleder, N., Batalden, K.B., Bos, J.M., Tester, D.J., Ommen, S.R., Wehrens, X.H.T., Claycomb, W.C., Ko, J., Hwang, M., Pan, Z., Ma, J., Ackerman, M.J. 2007. Mutations in *JPH2*-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42: 1026-1035.
- Larsen, L.A., Christiansen, M., Vuust, J., Andersen, P.S. 2001. Recent developments in high-throughput mutation screening. *Pharmacogenomics* 2(4): 387-399.
- LeWinter, M.L., Wu, Y., Labeit, S., Granzier, H.L. 2007. Cardiac titin: Structure, functions and role in disease. *Clinica Chimica Acta* 375: 1-9.
- Luther, P.K. 2009. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signaling. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 30: 171-185.

- Markham, N. e Zuker, M. DINAMelt. The RPI Bioinformatics Web Server. Hybridization Applications for DNA & RNA. In <http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/>.
- Maron, B.J., Doerer, J.J., Haas, T.S., Tierney, D.M., Mueller, F.O. 2009. Sudden Deaths in Young Competitive Athletes: Analysis of 1866 Deaths in the United States, 1980-2006. *Circulation* 119: 1085-1092.
- Maron, B.J. 2002. Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review. *JAMA* 287: 1308-1320.
- Maron, B.J., Shirani, J., Poliac, L.C., Mathenge, R., Roberts, W.C., Mueller, F.O. 1996. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic and pathological profiles. *JAMA* 276: 199-204.
- Maron, M.S., Maron, B.J., Harrigan, C., Buross, J., Gibson, C.M., Olivetto, I., Biller, L., Lesser, J.R., Udelson, J.E., Manning, W.J., Appelbaum, E. 2010. Hypertrophic cardiomyopathy phenotype revisited after 50 years with cardiovascular magnetic resonance. *Journal of the American College of Cardiology* 54(3): 220-228.
- Matsson, H., Eason, J., Bookwalter, C.S., Klar, J., Gustavsson, P., Sunnegardh, J., Enell, H., Jonzon, A., Vikkula, M., Gutierrez, I., Granados-Riveron, J., Pope, M., Bu'Lock, F., Cox, J., Robinson, T.E., Song, F., Brook, D.J., Marston, S., Trybus, K.M., Dahl, N. 2008. Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects. *Human Molecular Genetics* 17(2): 256-265.
- Medin, M., Hermida-Prieto, M., Monserrat, L., Laredo, R., Rodriguez-Rey, J.C., Fernandez, X., Castro-Beiras, A. 2007. Mutational screening of phospholamban gene in hypertrophic and idiopathic dilated cardiomyopathy and functional study of the *PLN* - 42 C>G mutation. *European Journal of Heart Failure* 9: 37-43.
- Merwe, L., Cloete, R., Revera, M., Heradien, M., Goosen, A., Corfield, V.A., Brink, P.A., Moolman-Smook, J.C. 2008. Genetic variation in angiotensin-converting enzyme 2 gene is associated with extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Genetics* 124: 57-61.
- Millat, G., Chanavat, V., Créhalet, H., Rousson, R. 2010. Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta* doi:10.1016/j.cca.2010.08.017.
- Mogensen, J., Perrot, A., Andersen, P.S., Havndrup, O., Klausen, I.C., Christiansen, M., Bross, P., Egeblad, H., Bundgaard, H., Osterziel, K.J., Haltern, G., Lapp, H., Reinecke, P.,

Gregersen, N., Børglum, A.D. 2004. Clinical and genetic characteristics of a cardiac actin gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Medical Genetics* 41: e10.

- Mogensen, J., Klausen, I.C., Pedersen, A.K., Egeblad, H., Bross, P., Kruse, T.A., Gregersen, N., Hansen, P.S., Baandrup, U., Børglum, A.D. 1999.  $\alpha$ -cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation* 103(10): R39-R43.

- Mohiddin, S.A., Ahmed, Z.M., Griffith, A.J., Tripodi, D., Friedman, T.B., Fananapazir, L., Morell, R.J. 2004. Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (*MYO6*). *Journal of Medical Genetics* 41: 309-314.

- Mudd, J.O., Kass, D.A. 2008. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451: 919-928.

- Muntoni, F., Bonne, G., Goldfarb, L.G., Mercuri, E., Piercy, R.J., Burke, M., Ben Yaou, R., Richard, P., Récan, D., Shatunov, A., Sewry, C.A., Brown, S.C. 2006. Disease severity in dominant Emery Dreifuss is increased by mutations in both emerin and desmin proteins. *Brain* 129: 1260-1268.

- Murphy, R.T., Mogensen, J., Shaw, A., Kubo, T., Hughes, S., McKenna, W.J. 2004. Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 363: 371-72.

- Norambuena, P.A., Copeland, J.A., Krenková, P., Stambergová, S., Macek, M. 2009. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the *MTHFR* gene. *Clinical Biochemistry* 42: 1308-1316.

- Niimura, H., Patton, K.K., McKenna, W.J., Soultis, J., Maron, B.J., Seidman J.G., Seidman, C.E. 2002. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 105: 446-451.

- Olson, T.M., Doan, T.P., Kishimoto, N., Whitby, F., Ackerman, M.J., Fananapazir, L. 2000. Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32: 1687-1694.

- Osio, A., Tan, L., Chen, S.N., Lombardi, R., Nagueh, S.F., Shete, S., Roberts, R., Willerson, J.T., Marian, A.J. 2007. Myozenin 2 is novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation Research* 100: 766-768.

- Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrus, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, F., Lamantea, E., Ferrero, I., Zeviani, M. 2005. Complete loss-of-

function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* 14(20): 3079-3088.

- Primer 3. Pick primers from a DNA sequence. In <http://frodo.wi.mit.edu/>.
- Primer-BLAST. A tool for finding specific primers. In <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.
- Razzaque, M.A., Nishizawa, T., Komoike, Y., Yagi, H., Furutani, M., Amo, R., Kamisago, M., Momma, K., Katayama, H., Nakagawa, M., Fujiwara, Y., Matsushima, M., Mizuno, K., Tokuyama, M., Hirota, H., Muneuchi, J., Higashinakagawa, T., Matsuoka, R. 2007. Germline gain-of-function mutations in *RAF1* cause Noonan syndrome. *Nature Genetics* 39(8): 1013-1017.
- Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnosis. *Pharmacogenomics* 8(6): 597-608.
- Reed, G.H., Wittwer, C.T. 2004. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry* 50(10): 1748-1754.
- Richard, P., Villard, E., Charron, F., Isnard, R. 2006. The genetic basis of cardiomyopathies. *Journal of the American College of Cardiology* 48(9): A79-A80.
- Robbins, S., Cotran, R., Kumar, V. 2003. The Heart. In *Robbins Basic Pathology*, 7<sup>a</sup> ed., pp 361-394, Saunders. Filadélfia.
- Roberts, R., Sigwart, U. 2001. New concepts in hypertrophic cardiomyopathies, part I. *Circulation* 104: 2113-2116.
- Roche Diagnostics. Roche Applied Science. Support and Resources. <https://www.roche-applied-science.com/techresources/index.jsp> in [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com).
- Rodriguez, J.E., McCudden, C.R., Willis, M.S. 2009. Familial hypertrophic cardiomyopathy: Basic concepts and future molecular diagnostics. *Clinical Biochemistry* 42: 755-765.
- Santos, S., Lança, V., Oliveira, H., Branco, P., Silveira, L., Marques, V., Brito, D., Madeira, H., Bicho, M., Fernandes, A.R. 2010. Genetic diagnostic of hypertrophic cardiomyopathy using mass spectrometry DNA arrays and high resolution melting. *Sociedade Portuguesa de Cardiologia. In press*.



- Satoh, M., Takahashi, M., Sakamoto, T., Hiroe, M., Marumo, F., Kimura, A. 1999. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262: 411-417.
- Schmidtman, A., Lindow, C., Villard, S., Heuser, A., Mügge, A., Geßner, R., Granier, C., Jaquet, K. 2005. Cardiac troponin C-L29Q, related to hypertrophic cardiomyopathy, hinders the transduction of the protein kinase A dependent phosphorylation signal from cardiac troponin I to C. *FEBS Journal* 272: 6087-6097.
- Seidman, J., Seidman, C.E. 2001. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104: 557-567.
- Shih, H., Er, T., Chang, T., Chang, Y., Liu, T., Chang, J. 2010. Development of a high-resolution melting method for the detection of hemoglobin alpha variants. *Clinical Biochemistry* 43: 671-676.
- Stoep, N., Paridon, C., Janssens, T., Krenkova, P., Stambergova, A., Macek, M., Matthijs, G., Bakker, E. 2009 Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of *BRCA1* mutation scanning using the 96-well lightscanner<sup>TM</sup>. *Human Mutation* 30(6): 899-909.
- Takano, E.A., Mitchell, G., Fox, S.B., Dobrovic, A. 2008. Rapid detection of carriers with *BRCA1* and *BRCA2* mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 8: 59.
- Taylor, C.F. 2009. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochemical Society Transactions* 37: 433-437.
- Taylor, M., Carniel, E., Mestroni, L. 2004. Familial hypertrophic cardiomyopathy: clinical features, molecular genetics and molecular genetic testing. *Expert Review of Molecular Diagnosis* 4(1): 99-113.
- Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H.P., Seidman, J.G., Seidman, C.E. 1994. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell Press* 77(5): 701-12.
- Tindall, E.A., Petersen, D.C., Woodbridge, P., Schipany, K., Hayes, V.M. 2009. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Human Mutation* 30: 876-883.
- UCSC Genome Browser. Human (*Homo sapiens*) Genome Browser Gateways. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> in <http://genome.ucsc.edu/>.

- Van Driest, S., Gakh, O., Ommen, S.R., Isaya, G., Ackerman, M.J. 2005. Molecular and functional characterization of a human frataxin mutation found in hypertrophic cardiomyopathy. *Molecular Genetics and Metabolism* 85: 280-285.
- Van Driest, S., Vasile, V.C., Ommen, S.R., Will, M.L., Tajik, A.J., Gersh, B.J., Ackerman, M.J. 2004. Myosin Binding Protein C Mutations and Compound Heterozygosity in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 44(9): 1903 – 1910.
- Vasile, V.C., Ommen, S.R., Edwards, W.D., Ackerman, M.J. 2006. A missense mutation in a ubiquitously expressed protein, vinculin, confers susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 998–1003.
- Vossen, R., Aten, E., Roos, A., Dunnen, J.T. 2009. High-resolution melting analysis (HRMA) – More than just a sequence variant screening. *Human Mutation* 30: 860-866.
- Wolfgang, F., Müller, O.J., Katus, H.A. 2001. Cardiomyopathies: from genetics to the prospect of treatment. *Lancet* 358: 1627 – 1637.
- Yamauchi-Takahara, K., Nakajima-Taniguchi, C., Matsui, H., Fujio, Y., Kunisada, K., Nagata, S., Kishimoto, T. 1996. Clinical implications of hypertrophic cardiomyopathy associated with mutations in the  $\alpha$ -tropomyosin gene. *Heart* 76: 63-65.
- Zeller, R., Ivandic, B.T., Ehlermann, P., Mücke, O., Zugck, C., Remppis, A., Giannitsis, E., Katus, H.A., Weichenham, D. 2006. Large-scale mutation screening in patients with dilated or hypertrophic cardiomyopathy: a pilot study using DGGE. *Journal of Molecular Medicine* 84: 682-691.

## VI. Apêndices

### Apêndice I – Condições Reacionais Aplicadas em Termociclador e em *LightCycler 480*<sup>®</sup>

| <i>Primers</i> |      |                                 | Termociclador                   |                              |         | <i>LightCycler 480</i> <sup>®</sup> |                              |         |
|----------------|------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------|-------------------------------------|------------------------------|---------|
| Gene           | Exão | Tamanho<br>amplificação<br>(pb) | [ <i>Primer</i> ]<br>( $\mu$ M) | [MgCl <sub>2</sub> ]<br>(mM) | Ta (°C) | [ <i>Primer</i> ]<br>( $\mu$ M)     | [MgCl <sub>2</sub> ]<br>(mM) | Ta (°C) |
| <i>ACTC1</i>   | 2    | 240                             | 0,5                             | 2                            | 57      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 3(1) | 176                             | 0,5                             | 2,5                          | 55      | -                                   | -                            | -       |
|                | 3(2) | 299                             | 0,5                             | 2                            | 57      | 0,5                                 | 2,5                          | 56      |
|                | 4    | 293                             | 0,5                             | 2,5                          | 57      | 0,5                                 | 2,5                          | 57      |
|                | 5(1) | 155                             | 0,5                             | 2                            | 57      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 5(2) | 229                             | 0,3                             | 2                            | 56      | 0,3                                 | 2                            | 56      |
|                | 6    | 293                             | -                               | -                            | -       | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 7(2) | 159                             | 0,5                             | 2,5                          | 56      | 0,5                                 | 2,5                          | 56      |
| <i>CASQ2</i>   | 1    | 116                             | 0,5                             | 2,5                          | 55      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
| <i>CAV3</i>    | 2    | 95                              | 0,3                             | 3,5                          | 56      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
| <i>CSRP3</i>   | 1    | 190                             | 0,5                             | 2,5                          | 56      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 2    | 233                             | 0,5                             | 2,5                          | 56      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 3    | 248                             | 0,2                             | 2                            | 55      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 4    | 228                             | 0,2                             | 2                            | 57      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 5    | 197                             | 0,3                             | 2                            | 57      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 6(1) | 296                             | 0,5                             | 2,5                          | 55      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 6(2) | 287                             | 0,3                             | 4                            | 55      | 0,3                                 | 3                            | 56      |
|                | 6(3) | 300                             | 0,5                             | 2,5                          | 55      | 0,3                                 | 2,5                          | 56      |
|                | 6(4) | 225                             | 0,5                             | 2,5                          | 55      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
| <i>COX15</i>   | 5    | 243                             | 0,2                             | 1,5                          | 58      | 0,5                                 | 2,5                          | 56      |
| <i>DES</i>     | 9(1) | 244                             | 0,3                             | 4                            | 56      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 9(2) | 237                             | 0,3                             | 4                            | 55      | 0,5                                 | 2,5                          | 56      |
|                | 9(3) | 249                             | 0,3                             | 3,5                          | 56      | -                                   | -                            | -       |
| <i>FXN</i>     | 1    | 227                             | 0,3                             | 5                            | 55      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
| <i>JPH2</i>    | 1(1) | 290                             | 0,5                             | 2                            | 55      | -                                   | -                            | -       |
|                | 1(2) | 214                             | 0,5                             | 2                            | 55      | 0,5                                 | 2,5                          | 56      |
|                | 1(3) | 253                             | 0,5                             | 2,5                          | 56      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 2(1) | 271                             | -                               | -                            | -       | -                                   | -                            | -       |
|                | 2(2) | 300                             | -                               | -                            | -       | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |
|                | 2(3) | 300                             | 0,5                             | 2,5                          | 57      | 0,5                                 | 2,5                          | 55      |

|               |       |     |     |     |    |     |     |    |
|---------------|-------|-----|-----|-----|----|-----|-----|----|
| <i>JPH2</i>   | 3     | 229 | -   | -   | -  | 0,5 | 2,5 | 55 |
|               | 4(1)  | 287 | 0,5 | 4   | 55 | -   | -   | -  |
|               | 4(2)  | 291 | 0,3 | 2   | 55 | -   | -   | -  |
|               | 4(3)  | 286 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |
|               | 5     | 246 | 0,3 | 4   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
| <i>MYBPC3</i> | 1     | 152 | 0,5 | 2,5 | 57 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|               | 2(1)  | 270 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 56 |
|               | 2(2)  | 242 | 0,3 | 2   | 55 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|               | 3     | 219 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |
|               | 4     | 219 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |
|               | 5     | 235 | 0,3 | 2,5 | 56 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|               | 6     | 234 | -   | -   | -  | 0,5 | 2   | 55 |
|               | 7     | 141 | 0,5 | 2,5 | 57 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|               | 8     | 192 | -   | -   | -  | 0,5 | 2,5 | 55 |
|               | 9     | 153 | 0,2 | 2   | 56 | -   | -   | -  |
|               | 10    | 139 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |
|               | 11(1) | 256 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
|               | 11(2) | 134 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
|               | 12    | 279 | 0,3 | 2,5 | 56 | -   | -   | -  |
|               | 13    | 193 | -   | -   | -  | 0,5 | 2,5 | 55 |
|               | 14    | 201 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|               | 15    | 245 | 0,3 | 2   | 55 | -   | -   | -  |
|               | 16    | 241 | 0,5 | 2,5 | 57 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|               | 17    | 144 | 0,3 | 2,5 | 60 | 0,3 | 2,5 | 60 |
|               | 18    | 114 | 0,2 | 2   | 56 | 0,2 | 2   | 56 |
|               | 19    | 257 | 0,2 | 2,5 | 60 | 0,3 | 2,5 | 60 |
|               | 20    | 168 | 0,2 | 3,5 | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|               | 21    | 226 | -   | -   | -  | 0,5 | 2,5 | 55 |
|               | 22    | 234 | 0,2 | 2   | 58 | 0,5 | 2   | 58 |
|               | 23(1) | 168 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 3   | 56 |
|               | 23(2) | 223 | 0,2 | 2   | 55 | -   | -   | -  |
|               | 24    | 240 | 0,5 | 2,5 | 55 | -   | -   | -  |
|               | 25    | 264 | 0,5 | 2,5 | 59 | -   | -   | -  |
|               | 26    | 193 | 0,2 | 2   | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|               | 27    | 304 | 0,2 | 2   | 56 | -   | -   | -  |
|               | 28    | 279 | 0,2 | 2   | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|               | 29    | 249 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |
|               | 30    | 227 | 0,2 | 2   | 56 | 0,2 | 2   | 55 |

|        |        |     |     |     |    |     |     |    |
|--------|--------|-----|-----|-----|----|-----|-----|----|
| MYBPC3 | 31     | 250 | 0,2 | 2,5 | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|        | 32     | 110 | 0,3 | 2   | 56 | 0,3 | 2   | 56 |
|        | Int 8  | 96  | 0,3 | 2,5 | 60 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|        | Int 15 | 98  | 0,3 | 4   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|        | Int 23 | 98  | 0,3 | 4   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
| MYH6   | 2      | 240 | 0,3 | 3   | 57 | 0,3 | 3   | 57 |
|        | 3      | 297 | 0,3 | 2,5 | 55 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|        | 4      | 240 | 0,5 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 56 |
|        | 5      | 240 | -   | -   | -  | 0,5 | 2   | 55 |
|        | 6      | 240 | 0,3 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 56 |
|        | 7      | 243 | 0,5 | 2,5 | 57 | -   | -   | -  |
|        | 8      | 243 | 0,5 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 56 |
|        | 10     | 195 | 0,2 | 3,5 | 56 | -   | -   | -  |
|        | 11+12  | 296 | 0,3 | 2   | 55 | -   | -   | -  |
|        | 13     | 283 | 0,5 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 56 |
|        | 20     | 228 | 0,3 | 3,5 | 56 | 0,3 | 3,5 | 56 |
| MYH7   | 3      | 252 | 0,2 | 2   | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|        | 4      | 294 | 0,2 | 2   | 55 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|        | 5      | 236 | 0,2 | 2   | 56 | 0,2 | 2   | 56 |
|        | 6      | 156 | 0,3 | 2,5 | 56 | 0,5 | 2   | 56 |
|        | 7      | 239 | 0,3 | 2,5 | 56 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|        | 8      | 172 | 0,3 | 2,5 | 56 | 0,2 | 2,5 | 56 |
|        | 9      | 163 | 0,2 | 2   | 56 | 0,2 | 2   | 56 |
|        | 10     | 240 | 0,3 | 2,5 | 55 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|        | 11     | 209 | 0,5 | 3,5 | 55 | -   | -   | -  |
|        | 12     | 249 | 0,2 | 2,5 | 56 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|        | 13     | 205 | 0,3 | 2,5 | 56 | 0,3 | 2,5 | 56 |
|        | 14     | 271 | 0,3 | 2,5 | 56 | 0,2 | 2,5 | 55 |
|        | 15     | 208 | 0,2 | 2   | 56 | -   | -   | -  |
|        | 16(2)  | 206 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|        | 17     | 246 | 0,3 | 2   | 56 | -   | -   | -  |
|        | 18     | 212 | 0,3 | 2   | 55 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|        | 19     | 193 | 0,2 | 2   | 56 | 0,2 | 2   | 56 |
|        | 20     | 243 | 0,3 | 2,5 | 55 | 0,3 | 2,5 | 55 |
|        | 21     | 221 | 0,2 | 2   | 60 | 0,2 | 2,5 | 58 |
|        | 22(1)  | 239 | 0,5 | 2,5 | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|        | 22(2)  | 141 | 0,5 | 4   | 55 | 0,5 | 4   | 55 |
|        | 23     | 217 | 0,5 | 2,5 | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |

|              |       |     |     |     |    |     |     |    |
|--------------|-------|-----|-----|-----|----|-----|-----|----|
| <i>MYH7</i>  | 24    | 249 | 0,3 | 2,5 | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 25    | 287 | 0,3 | 2   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 26    | 192 | 0,3 | 2,5 | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 27(1) | 273 | 0,3 | 2   | 55 | 0,5 | 3   | 56 |
|              | 27(2) | 297 | 0,5 | 2,5 | 56 | -   | -   | -  |
|              | 28    | 250 | -   | -   | -  | 0,5 | 3   | 55 |
|              | 29    | 231 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
|              | 30(1) | 221 | 0,2 | 2,5 | 56 | -   | -   | -  |
|              | 30(2) | 219 | 0,3 | 2   | 55 | 0,3 | 2   | 55 |
|              | 31    | 298 | 0,3 | 4   | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 32    | 199 | -   | -   | -  | 0,5 | 3   | 55 |
|              | 33    | 250 | 0,3 | 3,5 | 56 | -   | -   | -  |
|              | 34    | 290 | 0,2 | 2,5 | 56 | 0,5 | 2   | 55 |
|              | 35    | 275 | 0,3 | 4   | 56 | -   | -   | -  |
|              | 36    | 248 | 0,2 | 2   | 57 | -   | -   | -  |
|              | 37(1) | 212 | 0,3 | 2   | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 37(2) | 234 | 0,3 | 2   | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 38    | 220 | 0,5 | 2,5 | 57 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|              | 39    | 224 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 56 |
|              | 40    | 267 | 0,5 | 3,5 | 55 | 0,5 | 4   | 55 |
| <i>MYL2</i>  | 1     | 250 | 0,2 | 2   | 55 | -   | -   | -  |
|              | 2     | 117 | 0,5 | 2,5 | 60 | 0,5 | 2,5 | 59 |
|              | 3     | 202 | 0,2 | 2,5 | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 4     | 244 | 0,5 | 2,5 | 55 | 0,5 | 2,5 | 56 |
|              | 5     | 250 | 0,3 | 4   | 56 | 0,5 | 3   | 55 |
|              | 6     | 163 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
|              | 7(1)  | 205 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
|              | 7(2)  | 240 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
| <i>MYL3</i>  | 1     | 258 | 0,2 | 2,5 | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 2     | 164 | 0,5 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 55 |
|              | 3     | 232 | 0,5 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 56 |
|              | 4(1)  | 166 | 0,5 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 55 |
|              | 4(2)  | 196 | 0,5 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 56 |
|              | 5     | 214 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |
|              | 6     | 172 | 0,5 | 2,5 | 57 | -   | -   | -  |
| <i>MYLK2</i> | 2(1)  | 204 | 0,3 | 4   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 2(2)  | 207 | 0,5 | 2   | 55 | -   | -   | -  |
|              | 2(3)  | 198 | 0,5 | 4   | 56 | -   | -   | -  |

|                |      |     |     |     |    |     |     |    |
|----------------|------|-----|-----|-----|----|-----|-----|----|
| <i>MYO6</i>    | 9    | 260 | -   | -   | -  | 0,5 | 2,5 | 55 |
| <i>PLN</i>     | 1(1) | 165 | 0,3 | 3   | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 1(2) | 151 | 0,3 | 3   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
| <i>PRKAG2</i>  | 5    | 116 | 0,2 | 4   | 59 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 9    | 219 | 0,2 | 4   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 15   | 185 | 0,3 | 2   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
| <i>SLC25A4</i> | 2(1) | 211 | 0,2 | 4   | 55 | -   | -   | -  |
|                | 2(2) | 218 | 0,2 | 4   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 2(3) | 248 | 0,2 | 4   | 55 | -   | -   | -  |
| <i>TCAP</i>    | 1    | 112 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
|                | 2    | 367 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |
| <i>TNNC1</i>   | 1    | 147 | 0,5 | 2,5 | 57 | -   | -   | -  |
|                | 2    | 184 | 0,5 | 2,5 | 56 | 0,5 | 3   | 56 |
|                | 3    | 155 | 0,5 | 3   | 57 | 0,5 | 3   | 57 |
|                | 4    | 157 | 0,5 | 3   | 57 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|                | 5    | 159 | 0,5 | 2,5 | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 6    | 301 | 0,3 | 3,5 | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
| <i>TNNI3</i>   | 1    | 209 | 0,4 | 3   | 58 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|                | 2    | 170 | 0,5 | 2,5 | 58 | -   | -   | -  |
|                | 3    | 187 | 0,5 | 2   | 57 | -   | -   | -  |
|                | 4    | 108 | 0,3 | 3   | 56 | 0,5 | 3   | 56 |
|                | 5    | 221 | 0,5 | 2   | 56 | -   | -   | -  |
|                | 6    | 195 | 0,3 | 2   | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 7    | 250 | 0,5 | 2,5 | 56 | 0,5 | 3   | 55 |
|                | 8    | 218 | 0,3 | 2   | 57 | 0,5 | 2,5 | 55 |
| <i>TNNT2</i>   | 1    | 146 | 0,5 | 2,5 | 55 | -   | -   | -  |
|                | 2    | 208 | 0,5 | 2,5 | 57 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|                | 3    | 215 | 0,5 | 2,5 | 57 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|                | 4    | 100 | 0,2 | 2   | 56 | -   | -   | -  |
|                | 5    | 232 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
|                | 6    | 233 | 0,5 | 2,5 | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 7    | 227 | 0,5 | 2,5 | 55 | 0,5 | 3   | 56 |
|                | 8    | 219 | 0,5 | 2,5 | 57 | 0,5 | 2,5 | 57 |
|                | 9    | 108 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |
|                | 10   | 221 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 11   | 231 | 0,5 | 2,5 | 56 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|                | 12   | 236 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
|                | 13   | 247 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |

|              |       |     |     |     |    |     |     |    |
|--------------|-------|-----|-----|-----|----|-----|-----|----|
| <i>TNNT2</i> | 14    | 204 | 0,2 | 2   | 58 | 0,2 | 2,5 | 58 |
|              | 15    | 146 | 0,5 | 3   | 58 | -   | -   | -  |
|              | 16(1) | 224 | -   | -   | -  | 0,5 | 3   | 55 |
|              | 16(2) | 158 | -   | -   | -  | 0,5 | 2,5 | 55 |
| <i>TPM1</i>  | 2     | 257 | 0,2 | 2   | 55 | -   | -   | -  |
|              | 3     | 205 | 0,2 | 2   | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 4     | 218 | 0,5 | 3,5 | 55 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 5     | 175 | 0,5 | 2,5 | 65 | 0,5 | 2,5 | 55 |
|              | 6     | 224 | 0,5 | 2   | 55 | -   | -   | -  |
|              | 7     | 159 | 0,2 | 4   | 55 | 0,5 | 2,5 | 56 |
|              | 8     | 230 | 0,5 | 2   | 55 | 0,5 | 2   | 56 |
|              | 9     | 200 | 0,5 | 2,5 | 58 | 0,5 | 2,5 | 58 |
| <i>TTN</i>   | 14    | 109 | -   | -   | -  | -   | -   | -  |

Int - Intron

## Apêndice II – Construção de novos *Primers*

### Gene *TNNT2* (NM\_000364)

#### Exão 9

| <i>Primer</i>                    | Forward              | Reverse              |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b>         | GGTCGGGGCAGTGCTGGAAG | ACTCAACCCACAGCCACCGC |
| <b>Número de Bases</b>           | 20                   | 20                   |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>           | 59.69                | 59.55                |
| <b>%GC</b>                       | 70.00%               | 65.00%               |
| <b>ΔG</b>                        | 1,7                  | 1,5                  |
| <b>Tamanho amplificação (pb)</b> | 200                  |                      |

### Gene *JPH2* (NM\_020433)

#### Exão 2(1)

| <i>Primer</i>                    | Forward              | Reverse              |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b>         | CTTGCCCACTCCCGCCCTTG | CCAGGAGGCTGAGCGCGAAG |
| <b>Número de Bases</b>           | 20                   | 20                   |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>           | 59.97                | 59.97                |
| <b>%GC</b>                       | 70.00%               | 70.00%               |
| <b>ΔG</b>                        | 2,4                  | 0,8                  |
| <b>Tamanho amplificação (pb)</b> | 329                  |                      |



| Exão 2(2)                     |                      |                  |
|-------------------------------|----------------------|------------------|
| <i>Primer</i>                 | Forward              | Reverse          |
| <b>Sequência (5'→3')</b>      | GAGCACAGCAACGGCACGGT | TCGTCGGCGCCCTCGG |
| <b>Número de Bases</b>        | 20                   | 16               |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 60.52                | 59.02            |
| <b>%GC</b>                    | 65.00%               | 81.25%           |
| <b>ΔG</b>                     | -0,2                 | 0,4              |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 320                  |                  |

| Exão 2(3)                     |                      |                      |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Primer</i>                 | Forward              | Reverse              |
| <b>Sequência (5'→3')</b>      | AGCGCAGCCGTGTCAGCTTC | AGCGTGGTGCAGCCATAGCC |
| <b>Número de Bases</b>        | 20                   | 20                   |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 60.32                | 59.76                |
| <b>%GC</b>                    | 65.00%               | 65.00%               |
| <b>ΔG</b>                     | -0,1                 | 0,5                  |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 268                  |                      |

| Exão 2(4)                     |                      |                      |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Primer</i>                 | Forward              | Reverse              |
| <b>Sequência (5'→3')</b>      | GGGCGAGTGGCTGGACAACC | CCACCCCCACCGCTGTCCTA |
| <b>Número de Bases</b>        | 20                   | 20                   |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 59.97                | 70.00%               |
| <b>%GC</b>                    | 59.89                | 70.00%               |
| <b>ΔG</b>                     | 0,9                  | 1,5                  |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 246                  |                      |

| Exão 4(1)                     |                      |                      |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Primer</i>                 | Forward              | Reverse              |
| <b>Sequência (5'→3')</b>      | GGTTCGAGCCCAGCCTCCCT | GGCTCAGCAGGCCGTCCTTG |
| <b>Número de Bases</b>        | 20                   | 20                   |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 60.25                | 60.04                |
| <b>%GC</b>                    | 70.00%               | 70.00%               |
| <b>ΔG</b>                     | 1,9                  | 0,5                  |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 272                  |                      |

| Exão 4(2)                |                   |                    |
|--------------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Primer</i>            | Forward           | Reverse            |
| <b>Sequência (5'→3')</b> | GCCCCGAGCTGCACGAG | AGCCTCGATGGCCATGCG |
| <b>Número de Bases</b>   | 17                | 18                 |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>   | 58.78             | 57.20              |
| <b>%GC</b>               | 76.47%            | 66.67%             |
| <b>ΔG</b>                | 1,2               | 2,1                |

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Tamanho amplificação (pb) | 236 |
|---------------------------|-----|

**Exão 4(3)**

| <i>Primer</i>            | Forward              | Reverse              |
|--------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b> | GGCAGCCGGTCAGTCACTCC | GGGCTCGGGCTGGTCCTCAA |
| <b>Número de Bases</b>   | 20                   | 20                   |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>   | 59.42                | 60.53                |
| <b>%GC</b>               | 70.00%               | 70.00%               |
| <b>ΔG</b>                | 2,0                  | 1,4                  |

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Tamanho amplificação (pb) | 204 |
|---------------------------|-----|

**Exão 4(4)**

| <i>Primer</i>            | Forward            | Reverse              |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b> | CCCGAGCCCCACCTTTGA | GCCTTGCTCAGCCCTCGAGC |
| <b>Número de Bases</b>   | 20                 | 20                   |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>   | 60.47              | 59.77                |
| <b>%GC</b>               | 70.00%             | 70.00%               |
| <b>ΔG</b>                | 1,7                | 1,6                  |

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Tamanho amplificação (pb) | 218 |
|---------------------------|-----|

**Exão 4(5)**

| <i>Primer</i>            | Forward                | Reverse             |
|--------------------------|------------------------|---------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b> | AGCCCATCATCCCCAAAG     | CCTGAATCCTCCCTCAAGC |
| <b>Número de Bases</b>   | 18                     | 19                  |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>   | 50.68                  | 51.41               |
| <b>%GC</b>               | 55.56%                 | 57.89%              |
| <b>ΔG</b>                | Sem estrutura possível | 2,5                 |

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Tamanho amplificação (pb) | 209 |
|---------------------------|-----|

**Gene MYBPC3 (NM\_00256)**

**Exão 3**

| <i>Primer</i>            | Forward               | Reverse             |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b> | CTGCACCACGACTCCCATCTG | CCCTGGACACGCCCTACCC |
|                          |                       | A                   |
| <b>Número de Bases</b>   | 21                    | 22                  |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>   | 57.21                 | 59.89               |
| <b>%GC</b>               | 61.90%                | 70.00%              |
| <b>ΔG</b>                | 2,4                   | 1,5                 |

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Tamanho amplificação (pb) | 200 |
|---------------------------|-----|

**Exão 4**

| <i>Primer</i>                | Forward                | Reverse                    |
|------------------------------|------------------------|----------------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b>     | GCCTTTGCTCACAGGGTCAAGC | ACAGCAGCTCACACTCACCC<br>AC |
| <b>Número de Bases</b>       | 22                     | 22                         |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>       | 58.60                  | 59.03                      |
| <b>%GC</b>                   | 59.09%                 | 59.09%                     |
| <b>ΔG</b>                    | 1,6                    | 1,9                        |
| <b>Tamanho amplicão (pb)</b> | 131                    |                            |

#### Exão 10

| <i>Primer</i>                | Forward             | Reverse                  |
|------------------------------|---------------------|--------------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b>     | GAGTGCAAGTGC GGAAAA | CAGGACTGGGGGCCAAGGG<br>A |
| <b>Número de Bases</b>       | 18                  | 20                       |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>       | 50.66               | 59.82                    |
| <b>%GC</b>                   | 50.00%              | 70.00%                   |
| <b>ΔG</b>                    | 1,4                 | 1,5                      |
| <b>Tamanho amplicão (pb)</b> | 243                 |                          |

#### Exão 29

| <i>Primer</i>                | Forward              | Reverse               |
|------------------------------|----------------------|-----------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b>     | CCAGAGATGCCTCCCCTCCC | GGCCCCCTCTCCCTGTTCCCA |
| <b>Número de Bases</b>       | 21                   | 20                    |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>       | 57.21                | 59.89                 |
| <b>%GC</b>                   | 61.90%               | 70.00%                |
| <b>ΔG</b>                    | 1,2                  | 2,4                   |
| <b>Tamanho amplicão (pb)</b> | 200                  |                       |

### Gene *TCAP* (NM\_003673)

#### Exão 2(1)

| <i>Primer</i>                | Forward                 | Reverse                   |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b>     | CTCCCCAGCTGCTCCCTGCATGA | CTCCTTGGTGCGCCCATC<br>TTG |
| <b>Número de Bases</b>       | 23                      | 22                        |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>       | 62.41                   | 60.05                     |
| <b>%GC</b>                   | 65.22%                  | 63.64%                    |
| <b>ΔG</b>                    | 0,6                     | 1,4                       |
| <b>Tamanho amplicão (pb)</b> | 210                     |                           |

#### Exão 2(2)

| <i>Primer</i> | Forward | Reverse |
|---------------|---------|---------|
|---------------|---------|---------|

|                               |                     |                          |
|-------------------------------|---------------------|--------------------------|
| <b>Sequência (5'→3')</b>      | TCTTCACCCCTGCCAAGAT | CAGCAGCTCCCCTCCACAG<br>T |
| <b>Número de Bases</b>        | 19                  | 20                       |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 52.24               | 58.05                    |
| <b>%GC</b>                    | 52.63%              | 65.00%                   |
| <b>ΔG</b>                     | 1,7                 | 1,6                      |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 306                 |                          |

**Exão 2(3)**

|                               |                      |                          |
|-------------------------------|----------------------|--------------------------|
| <b>Primer</b>                 | Forward              | Reverse                  |
| <b>Sequência (5'→3')</b>      | GTCCCAGGAAGCACAGAGAG | TTGCCCTCACCAGTACCTT<br>T |
| <b>Número de Bases</b>        | 20                   | 20                       |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 53.94                | 52.88                    |
| <b>%GC</b>                    | 60.00%               | 50.00%                   |
| <b>ΔG</b>                     | 2,2                  | 2,0                      |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 300                  |                          |

**Exão 2(4)**

|                               |                    |                             |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <b>Primer</b>                 | Forward            | Reverse                     |
| <b>Sequência (5'→3')</b>      | GACCCTCAGCCCCAGGAG | TGCAACTCTGGCACATGAT<br>TGAG |
| <b>Número de Bases</b>        | 18                 | 23                          |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 55.22              | 55.78                       |
| <b>%GC</b>                    | 72.22%             | 47.83%                      |
| <b>ΔG</b>                     | 1,5                | 0,9                         |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 222                |                             |

**Gene *TTN* (NM\_133378)**

**Exão 14(1)**

|                               |                    |                       |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>Primer</b>                 | Forward            | Reverse               |
| <b>Sequência (5'→3')</b>      | TGTATTAATTCTGGAAAC | GACTGCTTTAGGGACAACGTG |
| <b>Número de Bases</b>        | 18                 | 21                    |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 38.30              | 53.49                 |
| <b>%GC</b>                    | 27.78%             | 52.38%                |
| <b>ΔG</b>                     | 2,4                | 2,0                   |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 254                |                       |

**Exão 14(2)**

|                          |                    |                   |
|--------------------------|--------------------|-------------------|
| <b>Primer</b>            | Forward            | Reverse           |
| <b>Sequência (5'→3')</b> | GAAGAATCCTATGCTCAG | TCACCAGATGACCACAG |

|                               |        |        |
|-------------------------------|--------|--------|
| <b>Número de Bases</b>        | 18     | 17     |
| <b>Tm Teórica (°C)</b>        | 43.50  | 47.00  |
| <b>%GC</b>                    | 44.44% | 52.94% |
| <b><math>\Delta G</math></b>  | 1,8    | 1,3    |
| <b>Tamanho ampliação (pb)</b> | 273    |        |

# ANEXOS

# Anexo I – Primers utilizados nas reacções de HRM e suas características

| Gene   | Exão | Tamanho<br>amplificação<br>(pb) | Primer  | Sequência (5' → 3')            | N.º de<br>bases | Tm<br>teórica<br>(°C) | % GC  | ΔG   |
|--------|------|---------------------------------|---------|--------------------------------|-----------------|-----------------------|-------|------|
| ACTC1  | 2    | 240                             | Forward | CAGGCAGCTAAGCGTGGT             | 18              | 60,16                 | 61,11 | 1,6  |
|        |      |                                 | Reverse | ACTGAAGGGTCCCCGAGT             | 18              | 59,48                 | 61,11 | 1,7  |
|        | 3(1) | 176                             | Forward | TTCCTGACATGGTGAGAGCA           | 20              | 60,40                 | 50    | 1,5  |
|        |      |                                 | Reverse | CTTCTCCATGTCTGCCAGT            | 20              | 60,11                 | 55    | 1,5  |
|        | 3(2) | 299                             | Forward | ACTGGGACGACATGGAGAAG           | 20              | 60,11                 | 55    | 1,5  |
|        |      |                                 | Reverse | TTCAACTGGGGGATCTGATT           | 20              | 59,34                 | 45    | 1,7  |
|        | 4    | 293                             | Forward | TGGCTAGAGCAGTGGTGTG            | 20              | 60,05                 | 55    | 1,0  |
|        |      |                                 | Reverse | GGTAGGCGGATTCAGTGAGA           | 20              | 60,22                 | 55    | 1,7  |
|        | 5(1) | 155                             | Forward | TCACTGAATCCGCCTACCTC           | 20              | 60,22                 | 55    | 2,8  |
|        |      |                                 | Reverse | AGCTGTGGCCATCTCATTCT           | 20              | 59,83                 | 50    | 1,4  |
|        | 5(2) | 229                             | Forward | GAACGTGAAATGTCCGTGA            | 20              | 59,55                 | 45    | 1,1  |
|        |      |                                 | Reverse | AGGGAAAATCGTGCCCTCTG           | 19              | 60,20                 | 52,63 | 1,6  |
|        | 6    | 293                             | Forward | ACCTTGACCTGAATGCACGT           | 21              | 59,64                 | 47,62 | 2,3  |
|        |      |                                 | Reverse | TCGGATCTCCCACTCACAA            | 19              | 60,19                 | 52,63 | 1,5  |
|        | 7(2) | 159                             | Forward | TGGAGTCTTCCAAACCACCT           | 20              | 59,55                 | 50    | 0,8  |
|        |      |                                 | Reverse | CCTACCCCAAAAACAAACGA           | 20              | 59,83                 | 45    | n.p. |
| CASQ2* | 1    | 116                             | Forward | ACGTTGGATGTTGCCTCTACTACCATGAGC | 30              | -                     | -     | -    |
|        |      |                                 | Reverse | ACGTTGGATGGCCCTTTGGTTACTTACCTC | 30              | -                     | -     | -    |
| CAV3*  | 2    | 95                              | Forward | ACGTTGGATGGCCCTTTGGTTACTTACCTC | 30              | -                     | -     | -    |
|        |      |                                 | Reverse | ACGTTGGATGTGTGGGCACCTACAGCTTTG | 30              | -                     | -     | -    |
| CSR3   | 1    | 190                             | Forward | CTCATTCACCTCTCCCTTG            | 20              | 59,65                 | 55    | 3,4  |
|        |      |                                 | Reverse | AAACCAGCCACAGAACCAAC           | 20              | 60,01                 | 50    | n.p. |
|        | 2    | 233                             | Forward | GGGGCCACTTCAATGTAGG            | 18              | 60,32                 | 57,89 | 2,1  |
|        |      |                                 | Reverse | TGTGATGCTGTCCGGATG             | 19              | 60,21                 | 55,56 | 1,9  |
|        | 3    | 248                             | Forward | TCAATTCCAATCCCATGACC           | 20              | 60,53                 | 45    | 2,1  |
|        |      |                                 | Reverse | TGGAGACTTTAACAGGCAAGG          | 21              | 59,36                 | 47,62 | 2,1  |
|        | 4    | 228                             | Forward | TTTGCCAAGGGAAATCTACG           | 20              | 60,07                 | 45    | 0,7  |
|        |      |                                 | Reverse | CCTGGTGGAGATGAGCAAT            | 20              | 60,07                 | 45    | 1,2  |
|        | 5    | 197                             | Forward | ACAGAATGTGTGCTACCTCA           | 22              | 59,66                 | 45,45 | 0,7  |
|        |      |                                 | Reverse | AGGGCCCTTTAGGGAAAAC            | 20              | 60,64                 | 50    | -1,1 |
|        | 6(1) | 296                             | Forward | CGTGCCTGGCGAACTTAT             | 18              | 59,82                 | 55,56 | 0,8  |
|        |      |                                 | Reverse | TGGGGAAAGGTATCGATCTG           | 20              | 59,89                 | 55    | 2,4  |
|        | 6(2) | 287                             | Forward | TGCACAGATCGATACCTTTCC          | 21              | 60,09                 | 47,62 | 2,3  |
|        |      |                                 | Reverse | TTATATGCTCTGCAACTCGTTTTT       | 24              | 59,40                 | 33,33 | 1,2  |
| COX15  | 6(3) | 300                             | Forward | TGGAATGGGAGAGGCAATAA           | 20              | 60,41                 | 45    | 2,8  |
|        |      |                                 | Reverse | TTTTGATTTTCTTTTAGATTTTGCT      | 26              | 59,93                 | 23,08 | 2,0  |
|        | 6(4) | 225                             | Forward | GGGGGTCTGGGAGAAAATAG           | 20              | 59,76                 | 55    | 1,9  |
|        |      |                                 | Reverse | GCTAAACCCAGGGAATTGT            | 20              | 60,19                 | 50    | 0,7  |
|        | 5    | 243                             | Forward | CCTTGTTTTGTTTGCTTCATCTC        | 23              | 60,16                 | 39,13 | 2,8  |
|        |      |                                 | Reverse | GCGGGGTCTTGAACACAG             | 18              | 60,25                 | 61,11 | 1,8  |
| DES    | 9(1) | 244                             | Forward | ATGGTTGGACTGGGCTTCT            | 19              | 59,52                 | 52,53 | 2,5  |
|        |      |                                 | Reverse | ATGGGCTATGTCGCTGTTG            | 19              | 59,69                 | 52,53 | 2,0  |
|        | 9(2) | 237                             | Forward | GTCCCCAACAGCGACATAG            | 19              | 59,10                 | 57,89 | 2,1  |
|        |      |                                 | Reverse | AGTCCTGGCCCTGCAGTAT            | 19              | 59,69                 | 57,89 | 1,6  |
|        | 9(3) | 249                             | Forward | GATACTGCAGGGCCAGGAC            | 19              | 60,64                 | 63,16 | 1,9  |
|        |      |                                 | Reverse | CATCTCACCCACTTTCTCTCCT         | 22              | 59,74                 | 50    | n.p. |
| FXN    | 1    | 227                             | Forward | ACAGCTAGGAAGTGGGCAGA           | 20              | 60,01                 | 55,00 | 1,9  |
|        |      |                                 | Reverse | ACGGAGTGCAACCAGGAC             | 19              | 59,67                 | 61,11 | 0,6  |
| JPH2   | 1(1) | 290                             | Forward | AGTGGTGATGGGGCTGAG             | 18              | 59,61                 | 61,11 | 1,9  |
|        |      |                                 | Reverse | GGGAAGGAGGGGTATTTCAA           | 20              | 61,12                 | 50    | 2,6  |
|        | 1(2) | 214                             | Forward | CTGCCTGCACTCAGTTCTCA           | 20              | 60,33                 | 55    | 1,7  |
|        |      |                                 | Reverse | CCCCCTTCTCCAATCCTG             | 18              | 60,40                 | 61,11 | 2,6  |
|        | 1(3) | 253                             | Forward | CAGGGGACTCTGAGAATGGA           | 20              | 60,19                 | 55    | 0,4  |
|        |      |                                 | Reverse | CTGGGACGGAAAGGTCAGT            | 19              | 60,10                 | 57,89 | 1,1  |
|        | 2(1) | 271                             | Forward | CTACTGACGCGCCCTCTC             | 18              | 59,68                 | 66,67 | 2,5  |
|        |      |                                 | Reverse | ATTGGCCAGGAGGCTGAG             | 18              | 61,34                 | 61,11 | -0,2 |
|        | 2(2) | 300                             | Forward | TCGCGCTCAGCCTCCT               | 16              | 62,07                 | 68,75 | 1,3  |
|        |      |                                 | Reverse | GTTTGTCGTCTTCCACTCG            | 20              | 58,34                 | 50    | 2,4  |
|        | 2(3) | 300                             | Forward | CTACATGGGCGAGTGAAGA            | 20              | 61,20                 | 55    | 2,4  |
|        |      |                                 | Reverse | CTGGAGGCGGCAATCTC              | 17              | 60,47                 | 64,71 | 2,4  |
|        | 3    | 229                             | Forward | GGCTGGTTCTCTGGAAGGAT           | 20              | 60,60                 | 55    | 1,3  |
|        |      |                                 | Reverse | AGAAAAGCGCCACCTTA              | 18              | 60,73                 | 55,56 | 2,6  |

|        |       |     |         |                                |    |       |       |      |
|--------|-------|-----|---------|--------------------------------|----|-------|-------|------|
| JPH2   | 4(1)  | 287 | Forward | GGATCACCCAACAGTGGTG            | 19 | 59,78 | 57,89 | 1,1  |
|        |       |     | Reverse | CAGGCCGTCTTGGACAC              | 18 | 62,74 | 66,67 | 0,5  |
|        | 4(2)  | 291 | Forward | CTGCACGAGCGTGAGACC             | 18 | 61,85 | 66,67 | 0,6  |
|        |       |     | Reverse | GCTGTGGTAGCCCTGGTAAA           | 20 | 60,13 | 50    | 1,0  |
|        | 4(3)  | 286 | Forward | GCTTTACCAAGGGCTACCACA          | 20 | 60,13 | 55    | 1,1  |
|        |       |     | Reverse | CTTCCGCGCCTTCTTCTT             | 18 | 60,61 | 50,56 | n.p. |
|        | 5     | 246 | Forward | CTCTGTCCAGCCTTGCTGT            | 19 | 59,14 | 57,89 | 0,7  |
|        |       |     | Reverse | CACCCTGGTGCTCAAACTC            | 20 | 60,69 | 55    | 1,5  |
|        | 1     | 152 | Forward | ACCCCACTCAGTCCCTCTTT           | 20 | 59,97 | 55    | 1,5  |
|        |       |     | Reverse | GCTCCCAATTGTAGACACC            | 20 | 59,41 | 55    | 2,2  |
| MYBPC3 | 2(1)  | 270 | Forward | TGCTAGCACAGTATTTACTGAGAGG      | 25 | 59,21 | 44    | 0,1  |
|        |       |     | Reverse | CCGCACTGTCAGCGTATG             | 18 | 60,0  | 61,11 | 0,7  |
|        | 2(2)  | 242 | Forward | CAGCGCCAGCAACAAGTA             | 18 | 59,72 | 55,56 | 0,9  |
|        |       |     | Reverse | GTGAAAGCACCTCCTGTTCC           | 20 | 59,70 | 55    | 1,3  |
|        | 3     | 219 | Forward | CACCACGACTCCCATCTGA            | 19 | 60,69 | 57,89 | 2,6  |
|        |       |     | Reverse | CAGCAAAGGCTTTTGAGACC           | 20 | 59,99 | 50    | 0,0  |
|        | 4     | 219 | Forward | GGGTGACAGAGCAAGACTCC           | 20 | 56    | 60    | 1,1  |
|        |       |     | Reverse | GGCTTGGGGAGTGTCTCTG            | 18 | 55    | 66,67 | 1,4  |
|        | 5     | 235 | Forward | CAGCAGGACACTCCCAAG             | 19 | 61,84 | 63,16 | 1,4  |
|        |       |     | Reverse | GTCCCTCTCTCCGTGTCTC            | 20 | 61,21 | 65    | 4,3  |
|        | 6     | 234 | Forward | GGCCACTCCCAGTCTCCT             | 18 | 60,20 | 66,67 | 1,3  |
|        |       |     | Reverse | AGCCAGGACAGACACCA              | 18 | 60,25 | 61,11 | 2,1  |
|        | 7*    | 141 | Forward | ACGTTGGATGCATCTCTCCACCTTTGAAC  | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGTCAGACTCCAGCACTGGCCT | 30 | -     | -     | -    |
|        | 8     | 192 | Forward | CCTTCAGGGTCTCGACTGG            | 19 | 60,80 | 63,16 | 1,8  |
|        |       |     | Reverse | CTGCGGATGGTGCAGGTAG            | 19 | 62,80 | 63,16 | 0,0  |
|        | 9*    | 153 | Forward | ACGTTGGATGACTCCCATCCTGCTCTAAT  | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGCCAGGACTCACCTCTTTTC  | 30 | -     | -     | -    |
|        | 10    | 139 | Forward | CAGGTCTTTGAGGGAAGGTG           | 20 | 59,69 | 55    | 2,2  |
|        |       |     | Reverse | GGCAGAATTAGGGGTGATGA           | 20 | 59,89 | 50    | 2,5  |
|        | 11(1) | 256 | Forward | GTGGCTACAGCTCCTTGGTC           | 21 | 59,87 | 60    | 1,3  |
|        |       |     | Reverse | CCTGTGCTCTTCTTCTCATCG          | 20 | 60,14 | 52,38 | 3,2  |
|        | 11(2) | 134 | Forward | CAGTACGGCGTCACTGACC            | 19 | 60,33 | 63,16 | 1,5  |
|        |       |     | Reverse | CCTGTGTAGGGAAGGGCTAG           | 20 | 58,81 | 60    | 1,1  |
|        | 12    | 279 | Forward | CCAGCCACAGCCACAGTAG            | 19 | 60,47 | 63,16 | 1,2  |
|        |       |     | Reverse | GGCAGGAGGCCAAGGCTAT            | 18 | 60,33 | 61,11 | 0,7  |
|        | 13    | 193 | Forward | CAGCTTTCCTGCCACTTCC            | 19 | 60,93 | 57,89 | 1,6  |
|        |       |     | Reverse | CAGGTTCACATCCTCAG              | 19 | 59,03 | 57,89 | 1,4  |
|        | 14    | 201 | Forward | CCAACCCTCATGCTCACC             | 18 | 60,05 | 61,11 | 3,0  |
|        |       |     | Reverse | CAAGTGCTGTGGCCTCTTCT           | 20 | 60,59 | 55    | 1,4  |
|        | 15    | 245 | Forward | CAGAAGAGGCCACAGCACT            | 19 | 59,14 | 57,89 | 1,0  |
|        |       |     | Reverse | GCCCTAAAGCCTCATGTG             | 19 | 60,76 | 57,89 | 2,0  |
|        | 16    | 241 | Forward | CGAGCTCAATGGCTCTGC             | 20 | 60,83 | 61,11 | 0,5  |
|        |       |     | Reverse | CATCTCAGTCTCCACCTGTCC          | 20 | 59,70 | 57,14 | 2,5  |
|        | 17*   | 144 | Forward | ACGTTGGATGCTGCAGGGTCCACAACTGA  | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGAGCAGGCTCACCCATGAAGT | 30 | -     | -     | -    |
|        | 18*   | 114 | Forward | ACGTTGGATGGTGCTACTTGCTCTCTCTC  | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGTGAGCAGAACCAAGACTCAG | 30 | -     | -     | -    |
|        | 19*   | 257 | Forward | ACGTTGGATGCTCCGTTTCTCTGAACTAC  | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGACTTGGCTGGTTCACACAC  | 30 | -     | -     | -    |
|        | 20*   | 168 | Forward | ACGTTGGATGTACTTCCCTCCTGGCTGTT  | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGTGAAAGACAAACGAGCCTCC | 30 | -     | -     | -    |
|        | 21*   | 226 | Forward | ACGTTGGATGATCTCACCCCAACTCTGCAC | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGCCTCTGTGTTCTCCAGCTTG | 30 | -     | -     | -    |
|        | 22    | 234 | Forward | GCTGATGTGGGTCCATCC             | 18 | 59,85 | 61,11 | 1,6  |
|        |       |     | Reverse | GAGGTGGCAGCTCTGGTCT            | 19 | 60,57 | 63,16 | 1,9  |
|        | 23(1) | 168 | Forward | CCTGGGTTCCAGACCAGAG            | 19 | 60,65 | 63,16 | 0,3  |
|        |       |     | Reverse | CCTGGGTTCCAGACCAGAG            | 20 | 60,04 | 55    | 1,0  |
|        | 23(2) | 223 | Forward | AGGGCGTGGTGTACGAGAT            | 19 | 60,55 | 57,89 | 0,0  |
|        |       |     | Reverse | GTATCCCCAGTCTGAGGATGA          | 20 | 59,89 | 55    | 1,3  |
|        | 24    | 240 | Forward | TGCTCAGACCCCTCTCTGAC           | 20 | 60,55 | 60    | 1,2  |
|        |       |     | Reverse | TGAATCTGCTCAATGGCAAG           | 20 | 59,95 | 45    | 1,2  |
|        | 25*   | 264 | Forward | ACGTTGGATGTGCTGCTGACACAGCCTG   | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGCTTGTGACTGCACAAAGGG  | 30 | -     | -     | -    |
|        | 26*   | 193 | Forward | ACGTTGGATGCCCTCACTTAGCTACCCACT | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGACACTATAGCCTCTCTCC   | 30 | -     | -     | -    |
|        | 27*   | 304 | Forward | ACGTTGGATGTTGGAGTGTACAGGTTTCAG | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGCAGGGAAGGGAAACAAGGG  | 30 | -     | -     | -    |
|        | 28*   | 279 | Forward | ACGTTGGATGTCACTGTGACGAGGCGTGGT | 30 | -     | -     | -    |
|        |       |     | Reverse | ACGTTGGATGTGAAGGGTAGCTGCGGCCTG | 30 | -     | -     | -    |



|        |         |     |         |                                |    |       |       |      |
|--------|---------|-----|---------|--------------------------------|----|-------|-------|------|
| MYBPC3 | 29      | 249 | Forward | GCTCTCGGCATCAGGAAG             | 18 | 59,61 | 61,11 | 1,1  |
|        |         |     | Reverse | CCCCTGGTTGGAAGAATGA            | 19 | 60,84 | 52,63 | 0,9  |
|        | 30*     | 227 | Forward | ACGTTGGATGTAGCTTTGTGTGGCCCTCTC | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGCTGGACGCGCTAAAGT     | 30 | -     | -     | -    |
|        | 31      | 250 | Forward | GCTTGCTCCGTTGTCCTC             | 19 | 60,94 | 57,89 | 2,1  |
|        |         |     | Reverse | AGCCTCCCATTACTGATGG            | 20 | 59,01 | 50    | 1,6  |
|        | 32      | 110 | Forward | AAGGCTGGGAGGACACAGT            | 19 | 59,70 | 57,89 | 1,2  |
|        |         |     | Reverse | GACTTGTGCCCTGGGTGT             | 18 | 59,50 | 61,11 | 2,2  |
|        | Int 8*  | 96  | Forward | ACGTTGGATGTGGACCTCCTATCAGCCTTC | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGTGACACTCCAGCACTGGCCT | 30 | -     | -     | -    |
|        | Int 15* | 98  | Forward | ACGTTGGATGAGCCAACCCTCATGCTCAC  | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGATACCAGCTGGTCTCCAA   | 30 | -     | -     | -    |
|        | Int 23* | 98  | Forward | ACGTTGGATGTGCGTCTGGCAGCTTGGAT  | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGACGAGCAACGTTACTCAAGG | 30 | -     | -     | -    |
| MYH6   | 2       | 240 | Forward | TGCGTCTTTCCCTTTCTGAC           | 20 | 60,38 | 57,89 | 3,0  |
|        |         |     | Reverse | GAAGCATGCCCCAGTCTCT            | 19 | 60,37 | 57,89 | 2,5  |
|        | 3       | 297 | Forward | CAGGAGTAACATAGCCCTCCTGT        | 23 | 60,89 | 52,17 | 0,3  |
|        |         |     | Reverse | TCTTTCCAGACCTCCTTCC            | 20 | 60,57 | 55    | 1,6  |
|        | 4       | 240 | Forward | GGTCACTCATCTCTGCTT             | 20 | 59,26 | 55    | 2,8  |
|        |         |     | Reverse | TGGCTTATTTAGGCCTCCAC           | 20 | 59,18 | 50    | 1,0  |
|        | 5       | 240 | Forward | CTCATGCCAGCCTTGTC              | 18 | 60,36 | 61,11 | 2,0  |
|        |         |     | Reverse | GGAGGAGGAGCAGAGACCA            | 19 | 60,50 | 61,16 | 2,1  |
|        | 6       | 240 | Forward | ATGCTGAGCCCTGTATGGAG           | 20 | 54    | 55    | 0,9  |
|        |         |     | Reverse | TTAGGGGTAATCGGGTCAG            | 20 | 54    | 55    | 1,0  |
|        | 7       | 243 | Forward | ATGCTGAGCCCTGTATGGAG           | 20 | 60,24 | 55    | 0,9  |
|        |         |     | Reverse | TTAGGGGTAATCGGGTCAG            | 20 | 59,05 | 55    | 1,0  |
|        | 8       | 243 | Forward | TCCCTCACTCTGTCCCATTC           | 20 | 60,05 | 55    | 2,0  |
|        |         |     | Reverse | AGGCGAGAAGATGTGGCTTA           | 20 | 59,98 | 50    | -1,3 |
|        | 10      | 195 | Forward | TCCTTCCTCACTGCCTTC             | 19 | 60,33 | 57,89 | n.p. |
|        |         |     | Reverse | AGTCGTTGGGGTGTGCAG             | 18 | 60,75 | 61,11 | 2,4  |
|        | 11+12   | 296 | Forward | ATGGCCACCGATGTGAGT             | 18 | 59,92 | 55,56 | 0,8  |
|        |         |     | Reverse | GCCTGGTCAGCACCTCAG             | 18 | 60,58 | 66,67 | 1,3  |
| MYH7   | 13      | 283 | Forward | GAAGTGCTCACTTATCCTTTCC         | 22 | 57,12 | 45,45 | 0,5  |
|        |         |     | Reverse | GCGATGTCCAGGACTCCTAT           | 20 | 59,12 | 50    | 1,1  |
|        | 20      | 228 | Forward | CACCCTGGATACCTCCCCTCT          | 20 | 60,33 | 60    | 1,4  |
|        |         |     | Reverse | TCTAGTGCATGCCTCCCTTT           | 20 | 59,84 | 50    | 2,5  |
|        | 3*      | 252 | Forward | ACGTTGGATGTTCTGCTCACTCCAGGCACA | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGACACCCACCTTGCCATACTC | 30 | -     | -     | -    |
|        | 4       | 294 | Forward | TGAGCACTATTGCCCTGTCA           | 20 | 60,41 | 50    | 0,9  |
|        |         |     | Reverse | CATGGATGGAGCAAGAACAG           | 20 | 59,24 | 50    | 2,4  |
|        | 5*      | 236 | Forward | ACGTTGGATGCACCTGCTCCTTTCTATCCC | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGAGTTCCTTCAGGAAGACCC  | 30 | -     | -     | -    |
|        | 6       | 156 | Forward | GAGGGAGAAGGAAGGGAGAA           | 20 | 59,75 | 55    | n.p. |
|        |         |     | Reverse | GCTGGGATCAGGGAGATTC            | 19 | 59,56 | 57,89 | 0,8  |
|        | 7       | 239 | Forward | CCAGGCATTCTCTCTGATT            | 20 | 59,24 | 50    | 0,6  |
|        |         |     | Reverse | TCTTCTCCCTCCCTTTCTGC           | 20 | 60,84 | 55    | n.p. |
|        | 8       | 172 | Forward | GCTCTACCTGCCTCCTTC             | 19 | 60,09 | 63,16 | 2,4  |
|        |         |     | Reverse | TTCCTCCACCAGTCCAAGTC           | 20 | 60,09 | 55    | 2,3  |
|        | 9*      | 163 | Forward | ACGTTGGATGACTATCACTCTCTTCC     | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGTAGAGCAAGGGTGAGCTTAG | 30 | -     | -     | -    |
|        | 10      | 240 | Forward | TCTGCCCTTTGCTTGCTACA           | 20 | 60,13 | 50    | 1,1  |
|        |         |     | Reverse | ACCAGGTTGCCATGGAGATA           | 20 | 59,67 | 55    | 1,0  |
|        | 11      | 209 | Forward | TTGTGTCCCACCCTAACCAT           | 20 | 60,09 | 50    | 1,9  |
|        |         |     | Reverse | CTGCTTTTGGACCCTGTT             | 19 | 60,10 | 52,63 | 1,4  |
|        | 12      | 249 | Forward | GGGATCTCACTTACCATCATACT        | 24 | 59,64 | 45,83 | 1,2  |
|        |         |     | Reverse | CCCTCCATGACTTGACAGC            | 19 | 59,20 | 57,89 | 1,6  |
|        | 13      | 205 | Forward | CTGGCCAGCAGTCATCTCTT           | 20 | 60,55 | 55    | 1,5  |
|        |         |     | Reverse | CTGCCACCCATTATCATCT            | 20 | 59,77 | 50    | 2,4  |
|        | 14      | 271 | Forward | CCCTGCTCAATATGGGTCTC           | 20 | 59,51 | 55    | 1,6  |
|        |         |     | Reverse | GGTCCACAGCTGGCTCTAAG           | 20 | 60,01 | 60    | 1,3  |
|        | 15*     | 208 | Forward | ACGTTGGATGCCTGCTCACTCAACGCTTTG | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGAAAGAGGCACCTTCTCGATG | 30 | -     | -     | -    |
|        | 16(2)*  | 206 | Forward | ACGTTGGATGAAGCCTGAAGCCCACTTCTC | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGTCCCTACTTACGCGCATCAG | 30 | -     | -     | -    |
|        | 17      | 246 | Forward | GGATGTAAGAGGGGCTGTG            | 20 | 59,55 | 55    | 1,4  |
|        |         |     | Reverse | GGGAGGAGTAGGGGATGAAC           | 20 | 59,75 | 60    | 2,5  |
|        | 18      | 212 | Forward | TGCATCTCTTTCTGGCATTTT          | 21 | 59,89 | 38,10 | 1,6  |
|        |         |     | Reverse | TGTCTAGGAGGTCTGTTC             | 21 | 60,50 | 57,14 | 0,7  |
|        | 19*     | 193 | Forward | ACGTTGGATGCTACTTCTTCTTGCCACAG  | 30 | -     | -     | -    |
|        |         |     | Reverse | ACGTTGGATGCTGTTCTATGAGCTCTGGTG | 30 | -     | -     | -    |

|      |       |     |         |                                |    |       |       |      |
|------|-------|-----|---------|--------------------------------|----|-------|-------|------|
| MYH7 | 20    | 243 | Forward | CAGATCACTGCAGAGCATGG           | 20 | 60,58 | 55    | 1,4  |
|      |       |     | Reverse | CAACAGGAAAAGCATCAGAGG          | 21 | 59,86 | 47,62 | 2,5  |
|      | 21    | 221 | Forward | CCTCGTACCCCTCCCTAGTC           | 20 | 59,95 | 65    | 2,5  |
|      |       |     | Reverse | CTCAGAGAAGCGGAAACCT            | 20 | 60,89 | 55    | 0,6  |
|      | 22(1) | 239 | Forward | AGGCTCAGCACTCCTTTCAA           | 20 | 60,13 | 50    | 1,6  |
|      |       |     | Reverse | TCTTCTCCTCCAGCTCCTTG           | 20 | 59,67 | 55    | 2,0  |
|      | 22(2) | 141 | Forward | CCTCAAAGAGGCGCTAGAGA           | 20 | 59,85 | 55    | 0,9  |
|      |       |     | Reverse | GGGTGGAAGAGCCAACAGTA           | 20 | 60,11 | 55    | 0,9  |
|      | 23    | 217 | Forward | AACAGCCTCCCCTCTGTTC            | 19 | 59,24 | 57,89 | 1,0  |
|      |       |     | Reverse | CATCGATGTCCCTTTTGAGC           | 20 | 60,60 | 50    | 2,5  |
|      | 24    | 249 | Forward | GCTGGTGACCTTTGACCCTA           | 20 | 60,11 | 55    | 2,1  |
|      |       |     | Reverse | GGCCCCACAACCTCAATC             | 19 | 60,47 | 57,89 | 3,4  |
|      | 25    | 287 | Forward | TCCTGAGGTAACGAACAACAAAAT       | 25 | 60,30 | 36    | -0,2 |
|      |       |     | Reverse | TTGGGTCTGCTTGTACTGTTATG        | 23 | 59,21 | 43,48 | 2,4  |
|      | 26    | 192 | Forward | CCCACGAGTCTCCCTTACCT           | 20 | 60,50 | 60    | 1,5  |
|      |       |     | Reverse | GCAGGGGAAACAGAACCAG            | 19 | 60,64 | 57,89 | 2,0  |
|      | 27(1) | 273 | Forward | GCTAAACTGACTTGCTGTTCCA         | 22 | 59,56 | 45,45 | 1,2  |
|      |       |     | Reverse | CTCGCGTTCCTTGTTCACT            | 20 | 60,68 | 50    | 2,6  |
|      | 27(2) | 297 | Forward | CAGATCGAGATGAACAAGAAGC         | 22 | 59,08 | 45,45 | 1,7  |
|      |       |     | Reverse | GGAGGTGGGAGGAGGAAGT            | 19 | 60,45 | 63,16 | 4,0  |
|      | 28    | 250 | Forward | GCACCTCTTACACCCCTTCA           | 20 | 60,11 | 55    | n.p. |
|      |       |     | Reverse | TCAGGAGGTTGGGGAGACT            | 19 | 59,62 | 57,89 | 1,5  |
|      | 29    | 231 | Forward | AGAGGAGGAGGTGGGGATAG           | 20 | 59,51 | 60    | 1,9  |
|      |       |     | Reverse | TGCAAGGCTAGTCAGTGTGC           | 20 | 60,21 | 55    | 1,9  |
|      | 30(1) | 221 | Forward | GTGGGTGTGCTTTATGGAGA           | 20 | 59,93 | 50    | 2,3  |
|      |       |     | Reverse | GCGTCCGTCTCATACTTGGT           | 20 | 50,14 | 55    | 2,2  |
|      | 30(2) | 219 | Forward | CCAGTGGAGGACCAAGTATGA          | 21 | 59,97 | 52,38 | 1,0  |
|      |       |     | Reverse | CCCTGAGAGGAGAAGGAGGT           | 20 | 59,80 | 60    | 0,8  |
|      | 31    | 298 | Forward | ATCCACACCCTCCACTCTC            | 19 | 59,71 | 57,89 | 3,8  |
|      |       |     | Reverse | CCTCTCACTGAACCCCTCAT           | 20 | 59,10 | 55    | 1,8  |
|      | 32    | 199 | Forward | GGGGGTGAAGAGTGAGC              | 18 | 60,92 | 66,67 | 1,9  |
|      |       |     | Reverse | CCTGCAGGTTTTTGTCTCC            | 20 | 59,71 | 50    | 1,9  |
|      | 33    | 250 | Forward | CTCCAACTCCACTGGACCTC           | 20 | 59,68 | 60    | 1,4  |
|      |       |     | Reverse | GGATGAGAACAGGGACCAAA           | 20 | 59,90 | 50    | 2,0  |
|      | 34    | 290 | Forward | CTGTGCCCTGACTGTCTGC            | 19 | 60,63 | 63,16 | 2,4  |
|      |       |     | Reverse | AGCTGGATCTCCATCTCATTG          | 21 | 59,25 | 47,62 | 1,0  |
|      | 35    | 275 | Forward | CCTGCTCATGCCACTCT              | 18 | 59,94 | 61,11 | 1,4  |
|      |       |     | Reverse | AGCCTGTGCTCCCTTCAG             | 18 | 59,07 | 61,11 | 2,6  |
|      | 36    | 248 | Forward | TTTCCTGCTTGCCCAAC              | 18 | 59,92 | 55,56 | 2,0  |
|      |       |     | Reverse | CACATGGTCTGGTCAAGTCCT          | 21 | 60,02 | 52,38 | 2,0  |
|      | 37(1) | 212 | Forward | AAGTGTGTGAGGACTTGACCAG         | 22 | 59,27 | 50    | 1,8  |
|      |       |     | Reverse | AGCTTCTGCAGCTGCTTCTT           | 20 | 59,67 | 50    | 0,2  |
|      | 37(2) | 234 | Forward | GAGCAGATCGCCCTCAAG             | 18 | 59,61 | 61,11 | -5,2 |
|      |       |     | Reverse | CTTCTCATTTCTCCTCAGCTGGT        | 22 | 60,02 | 50    | 1,0  |
|      | 38    | 220 | Forward | CCTTCTATGACTGTGCCATCTTC        | 23 | 60,14 | 47,83 | 2,5  |
|      |       |     | Reverse | TTCTCAGACTCCTGGCTTGG           | 20 | 60,52 | 55    | 1,6  |
|      | 39    | 224 | Forward | CCCCCTCACCTCATGCTC             | 19 | 60,78 | 63,16 | 1,9  |
|      |       |     | Reverse | TCTGTCTGGGTATGCCTGCT           | 20 | 60,82 | 55    | 1,3  |
|      | 40    | 267 | Forward | GCCCAATACCATCTCTCCAA           | 20 | 59,89 | 50    | 2,1  |
|      |       |     | Reverse | CACTCCCTGCATTTC                | 18 | 60,62 | 55,56 | 3,0  |
| MYL2 | 1     | 250 | Forward | ACTTCAGAAGAACGGCATGG           | 20 | 60,25 | 50    | 1,2  |
|      |       |     | Reverse | CGCTTGTAAGTGCTTCTCT            | 20 | 59,64 | 55    | 2,2  |
|      | 2*    | 117 | Forward | ACGTTGGATGAGGCACCTAAGAAAGCAAAG | 30 | -     | -     | -    |
|      |       |     | Reverse | ACGTTGGATGCCACCTCCTTAAATTCCTG  | 30 | -     | -     | -    |
|      | 3     | 202 | Forward | AATCTCTTGGGCAACTCTGC           | 20 | 59,43 | 50    | 1,0  |
|      |       |     | Reverse | CTCCTGTCCTCATGGATGT            | 20 | 60,22 | 55    | 1,0  |
|      | 4     | 244 | Forward | GGAATCCCAGGAGCCAAT             | 20 | 59,73 | 50    | 0,4  |
|      |       |     | Reverse | CCCCGAAGAAACATAGACA            | 20 | 59,42 | 55    | n.p. |
|      | 5     | 250 | Forward | CCTTCATCTCTGGGGAACT            | 20 | 60,45 | 55    | 1,4  |
|      |       |     | Reverse | TTGGTGTGAGTTGTGTGTGTG          | 20 | 59,05 | 47,62 | 2,3  |
|      | 6     | 163 | Forward | TGACACCAACACTGCTTTC            | 20 | 59,73 | 50    | 2,3  |
|      |       |     | Reverse | TTAGACGAGAGGGGAGACG            | 20 | 59,42 | 55    | 2,1  |
| MYL3 | 7(1)  | 205 | Forward | CGTCCTTAGCACGTGTGTC            | 19 | 60,47 | 57,89 | 0,8  |
|      |       |     | Reverse | GGTACTCGGGGGAGAGAGAT           | 20 | 59,52 | 60    | 1,1  |
|      | 7(2)  | 240 | Forward | GCTCGTCTTTGCAGAGTGGT           | 20 | 60,60 | 55    | 1,9  |
|      |       |     | Reverse | GGCACTGTTTGTGAGAGAAATG         | 22 | 59,78 | 45,45 | 0,4  |
|      | 1     | 258 | Forward | CCCTGCTTCTGCACTTCTC            | 20 | 59,96 | 50    | 0,6  |
|      |       |     | Reverse | TGCCTCTTGCTAGGTCCACT           | 20 | 60,01 | 55    | 0,6  |
|      | 2     | 164 | Forward | GGACAGGCTGAGACAGTTGAC          | 21 | 59,90 | 57,14 | 1,6  |
|      |       |     | Reverse | CAACCCCTGGGTTCAAGAC            | 19 | 60,35 | 57,89 | 0,0  |

|         |      |     |         |                                |    |       |       |      |
|---------|------|-----|---------|--------------------------------|----|-------|-------|------|
| MYL3    | 3    | 232 | Forward | GTAGGCTGACCCTGGGAGT            | 19 | 59,12 | 63,16 | 0,7  |
|         |      |     | Reverse | TAACACTATGGGGGCTCTCG           | 20 | 60,09 | 55    | 2,3  |
|         | 4(1) | 166 | Forward | AGCCTTAGACCCTGGAACCT           | 20 | 59,21 | 55    | 1,8  |
|         |      |     | Reverse | ATTGCCCTCCTTGTCGAAG            | 19 | 60,20 | 52,63 | 2,3  |
|         | 4(2) | 196 | Forward | CCAGCACATTTCCAAGAACA           | 20 | 59,69 | 45    | 2,5  |
|         |      |     | Reverse | GGCAACAGAGTGGTTTCTCC           | 20 | 59,70 | 55    | 1,6  |
|         | 5    | 214 | Forward | GGAGAGGTTGAGCCACCAT            | 19 | 60,06 | 57,89 | 1,0  |
|         |      |     | Reverse | CTCCCCCTCCAGAAGACC             | 18 | 59,56 | 66,67 | 2,0  |
|         | 6    | 172 | Forward | TCCCCATGTTGCACTCCT             | 19 | 60,05 | 55,56 | 1,5  |
|         |      |     | Reverse | GAGGCAGCAGGATGTCAAGT           | 20 | 60,42 | 55    | 1,6  |
| MYLK2   | 2(1) | 204 | Forward | TCCTGATGGGTGTCTCACCT           | 20 | 60,53 | 55    | 0,6  |
|         |      |     | Reverse | GGGCCTTGCGTGTCTAGTT            | 18 | 60,36 | 61,11 | 0,5  |
|         | 2(2) | 207 | Forward | TGGCCCAACCCTCAACTA             | 18 | 60,04 | 55,56 | 1,2  |
|         |      |     | Reverse | CCTCTGCTGCCTTCTTGC             | 18 | 59,81 | 61,11 | 2,0  |
|         | 2(3) | 198 | Forward | AGACTGCGACACCTGAGACC           | 20 | 60,47 | 60    | 2,3  |
|         |      |     | Reverse | CACTCCCAGGAGGGGATATT           | 20 | 60,15 | 55    | -0,6 |
| MYO6    | 9    | 260 | Forward | TTTTCCCTTTATTGGTGA             | 20 | 57,08 | 35    | 2,6  |
|         |      |     | Reverse | CTTCAGAAGCACCAGCACAC           | 20 | 59,02 | 55    | 0,7  |
| PLN     | 1(1) | 165 | Forward | TCCAGGCTACCTAAAAGAAGACA        | 23 | 53    | 43,48 | 1,1  |
|         |      |     | Reverse | AGGCATTTCAATGGTTGAGG           | 20 | 50    | 45    | 1,2  |
|         | 1(2) | 151 | Forward | TGGAATGCCTCAACAAGCAC           | 20 | 52    | 50    | 1,3  |
|         |      |     | Reverse | TAAGCTGATGTGGCAAGCTG           | 20 | 52    | 50    | 0,5  |
| PRKAG2  | 5*   | 116 | Forward | ACGTTGGATGGCTTTCCCGATACTAAAAGA | 30 | -     | -     | -    |
|         |      |     | Reverse | ACGTTGGATGTTGCAGGTACAGATTTATG  | 30 | -     | -     | -    |
|         | 9    | 219 | Forward | CCGCCTCATTTTCTAATTGC           | 20 | 59,68 | 45    | 2,2  |
|         |      |     | Reverse | AACATAGCTTTCCCGATACTAAAAGA     | 26 | 59,96 | 34,62 | 1,6  |
|         | 15   | 185 | Forward | TTAATTTTCACGTGCTCTGCTTT        | 23 | 60,05 | 34,78 | 2,6  |
|         |      |     | Reverse | TTCTACCTCCCACCCTTCCT           | 20 | 59,93 | 55    | n.p. |
| SLC25A4 | 2(1) | 211 | Forward | TCTACCCTGCCTGTCTCTCTG          | 20 | 60,40 | 60    | 2,6  |
|         |      |     | Reverse | GTCTTGAAGGCGAAGTTGA            | 20 | 60,38 | 50    | 1,3  |
|         | 2(2) | 218 | Forward | AGCTCTCAACTTCGCCTTCA           | 20 | 60,28 | 50    | 2,4  |
|         |      |     | Reverse | CCAGACCATGGAACCTCACG           | 19 | 60,10 | 57,89 | 0,4  |
|         | 2(3) | 248 | Forward | CTACCCGCTGGACTTTGCTA           | 20 | 60,40 | 55    | 0,7  |
|         |      |     | Reverse | CTTTCCACACCACCCTCCT            | 19 | 59,95 | 57,89 | n.p. |
| TCAP    | 1*   | 112 | Forward | ACGTTGGATGAGTGATCATGGCTACCTCAG | 30 | -     | -     | -    |
|         |      |     | Reverse | ACGTTGGATGTCAGATCCTTCCATTCTGCC | 30 | -     | -     | -    |
|         | 2*   | 367 | Forward | ACGTTGGATGAGACCTACCACCAGCAGGG  | 30 | -     | -     | -    |
|         |      |     | Reverse | ACGTTGGATGTGCTTCCTGGGACATGGAG  | 30 | -     | -     | -    |
| TNNC1   | 1    | 147 | Forward | GGGGCAGGGCTATTTAAGTC           | 20 | 54    | 55    | 1,9  |
|         |      |     | Reverse | CTGAGTGAGCCCCAGTG              | 18 | 55    | 56,67 | 2,5  |
|         | 2    | 184 | Forward | CTGTGGAATGGGTTGGTTTC           | 20 | 52    | 50    | 2,2  |
|         |      |     | Reverse | CCTGGGGTCTCTTCTGATAC           | 21 | 56    | 57,14 | 2,2  |
|         | 3    | 155 | Forward | CCAACCCCTGAACACAGAGT           | 20 | 54    | 55    | 1,4  |
|         |      |     | Reverse | CCACCTCATCGATCATCTCC           | 20 | 54    | 55    | 2,3  |
|         | 4    | 157 | Forward | CTCTGTAACGGCCATGCTG            | 19 | 53    | 57,89 | 1,8  |
|         |      |     | Reverse | TCACGTGCTCACTTGTCAAA           | 20 | 50    | 45    | 2,1  |
|         | 5    | 159 | Forward | CTCCCCACAGAAATGCTGAT           | 20 | 52    | 50    | 0,3  |
|         |      |     | Reverse | CCACCCGCTTACCATCATAG           | 20 | 54    | 55    | 3,2  |
|         | 6    | 301 | Forward | GCTGATCTCTGCCTCCAT             | 19 | 53    | 57,89 | 2,4  |
|         |      |     | Reverse | GGGACACAGAGCCAGATAG            | 20 | 56    | 60    | 1,4  |
| TNNI3   | 1    | 209 | Forward | GTCTGTGTCTCGCCCTTTA            | 20 | 60,25 | 55    | 2,8  |
|         |      |     | Reverse | CCAACCTCCACTGCCTTG             | 18 | 60,24 | 61,11 | 3,0  |
|         | 2    | 170 | Forward | GACACAGCCCAACCTAACC            | 20 | 60,43 | 60    | 2,3  |
|         |      |     | Reverse | TTACCGTACCGCACCTCT             | 19 | 60,52 | 57,89 | 2,1  |
|         | 3    | 187 | Forward | GGGTCTTGGTGGTGATGG             | 18 | 59,72 | 61,11 | 1,9  |
|         |      |     | Reverse | CACTCCCAGGGTCTTGGAT            | 19 | 59,90 | 57,89 | 1,1  |
|         | 4    | 108 | Forward | TGATCCTTCCTTGCTCCATC           | 20 | 60,16 | 50    | 2,5  |
|         |      |     | Reverse | CTGCCTGCTCTTTCCAGT             | 19 | 60,54 | 57,89 | 2,4  |
|         | 5    | 221 | Forward | CGCCTGGTCTTTATCCTGAA           | 20 | 60,21 | 50    | 2,5  |
|         |      |     | Reverse | TAGAAACCTCGCATCCTTGG           | 20 | 60,21 | 50    | 2,3  |
|         | 6    | 195 | Forward | TTCCCCAACACACACAC              | 19 | 60,25 | 52,63 | 2,9  |
|         |      |     | Reverse | GTCAGGCAGAGACCAAGTCC           | 20 | 59,89 | 60    | 1,6  |
|         | 7    | 250 | Forward | GTCAGGCAGAGACCAAGTCC           | 20 | 60,43 | 50    | 2,8  |
|         |      |     | Reverse | CCTCTTTCCTGGCCTTAGC            | 19 | 59,02 | 57,89 | 1,3  |
|         | 8    | 218 | Forward | GACCCTAACCTCTGACTCATCG         | 22 | 60,13 | 54,55 | 2,3  |
|         |      |     | Reverse | CTGCCTAAGCCCTGGGTAA            | 19 | 60,21 | 57,89 | 1,3  |
| TNNI2   | 1    | 146 | Forward | GCTTAAAGCCCTTCCATCC            | 20 | 60,17 | 55    | 1,3  |
|         |      |     | Reverse | CATCTCCCCGTCCATTCTC            | 19 | 60,42 | 57,89 | 3,3  |
|         | 2    | 208 | Forward | GCTCATGAGGGGTGGAACCTA          | 20 | 60,07 | 55    | 1,6  |
|         |      |     | Reverse | ACTCAGGCAAGATGTCTCA            | 19 | 59,52 | 52,63 | 1,0  |

|       |       |     |         |                                |    |       |       |      |
|-------|-------|-----|---------|--------------------------------|----|-------|-------|------|
| TNNT2 | 3     | 215 | Forward | AGGGAAAAGAAAGGGGGATT           | 20 | 60,12 | 45    | 1,9  |
|       |       |     | Reverse | CCAGGCAGCAAGAGAAGAGA           | 20 | 60,81 | 55    | n.p. |
|       | 4*    | 100 | Forward | ACGTTGGATGAACTGACCCACCTCTTCTC  | 30 | -     | -     | -    |
|       |       |     | Reverse | ACGTTGGATGAGGCACATACCTTCAACAGC | 30 | -     | -     | -    |
|       | 5     | 232 | Forward | GGCTCTCTGCTCCCAGACTA           | 20 | 59,70 | 60    | 0,9  |
|       |       |     | Reverse | GAGGAAACGACTGACCCACT           | 20 | 59,15 | 55    | 2,3  |
|       | 6     | 233 | Forward | TCTGGGTCTGCTGATAGC             | 20 | 60,36 | 55    | 1,4  |
|       |       |     | Reverse | ACATGGGAAAGCCTGTTCTG           | 20 | 60,11 | 50    | 1,3  |
|       | 7     | 227 | Forward | CCCCAAAAACCAACAGAGTG           | 20 | 60,38 | 50    | 2,0  |
|       |       |     | Reverse | ATTCTCCTCCAAAGCTGCTG           | 20 | 59,57 | 50    | 2,0  |
|       | 8     | 219 | Forward | GGAAATCCACAGGGATCTAGC          | 21 | 59,92 | 52,38 | 0,0  |
|       |       |     | Reverse | CGTGTCCTGACCATACT              | 20 | 59,62 | 55    | 1,7  |
|       | 9*    | 108 | Forward | ACGTTGGATGATTCTCTCTCCAACAGGTC  | 30 | -     | -     | -    |
|       |       |     | Reverse | ACGTTGGATGCACCGCTTACATCAAAGTCC | 30 | -     | -     | -    |
|       | 10    | 221 | Forward | CCCATCTCTCCTCTGGACTCT          | 21 | 59,82 | 57,12 | 1,6  |
|       |       |     | Reverse | CTGGGCCATCAGAGAATGTT           | 20 | 60,01 | 50    | 1,2  |
|       | 11    | 231 | Forward | TGTCACCTTCTCCCTATGCAC          | 21 | 60,13 | 52,38 | 3,1  |
|       |       |     | Reverse | TGACTGATTTCATTCATGTTGATG       | 24 | 57,89 | 33,33 | 1,9  |
|       | 12    | 236 | Forward | ATCAGGGTTTCCAATCCTTTC          | 21 | 59,79 | 42,86 | 0,9  |
|       |       |     | Reverse | GCAGTGGACACCTCATTCCT           | 20 | 60,12 | 55    | 1,8  |
|       | 13    | 247 | Forward | TCTGGCCAGTTTACTCTGCTT          | 21 | 59,14 | 42,62 | 1,6  |
|       |       |     | Reverse | CAGTCCTGCCCTCTGGTG             | 18 | 60,40 | 66,67 | 1,6  |
|       | 14    | 204 | Forward | CAGGAGGGCCCTTCTTACT            | 20 | 59,71 | 55    | 0,4  |
|       |       |     | Reverse | CCCAGTGAACCAAGGAG              | 19 | 60,65 | 63,16 | 0,4  |
|       | 15    | 146 | Forward | CAGCGTTGCTCTTTGTCCTT           | 20 | 60,57 | 50    | 0,8  |
|       |       |     | Reverse | GGGATAGCTGGAAGGTAGGG           | 20 | 59,92 | 60    | 1,0  |
|       | 16(1) | 224 | Forward | GCCGCATGGTGACCTACTAC           | 20 | 60,55 | 60    | 1,4  |
|       |       |     | Reverse | CCCCATTTCCAACAGGAG             | 19 | 60,29 | 52,63 | 0,5  |
|       | 16(2) | 158 | Forward | CAGCTCCTGTTTGGAAATGG           | 20 | 60,63 | 50    | 0,8  |
|       |       |     | Reverse | AGGGTCTCGCCTCAGTTTCT           | 20 | 60,39 | 55    | 1,3  |
| TPM1  | 2     | 257 | Forward | TCCCTGTCTTCTGGTCTG             | 20 | 60,23 | 55    | 1,7  |
|       |       |     | Reverse | GGTGAGGGAAGCAGTGTGA            | 19 | 59,81 | 57,89 | 1,8  |
|       | 3     | 205 | Forward | TCTCCCCAACTCTGAAATGC           | 20 | 60,20 | 50    | 1,9  |
|       |       |     | Reverse | AGCTGCAAAAGATGGCTGAT           | 20 | 59,98 | 45    | 1,4  |
|       | 4     | 218 | Forward | TGTGCATTGGGAAGTTTCTAG          | 20 | 59,96 | 45    | 2,0  |
|       |       |     | Reverse | ACTGCTGGGTGTCCACAAG            | 19 | 59,72 | 57,89 | 1,1  |
|       | 5*    | 175 | Forward | ACGTTGGATGGGTGTGTGTGTTGTGCTTC  | 30 | -     | -     | -    |
|       |       |     | Reverse | ACGTTGGATGTAGTCACTGCTCTGCAGCAC | 30 | -     | -     | -    |
|       | 6     | 224 | Forward | TGATTTTGTGAATGGCCTTG           | 20 | 59,52 | 40    | 1,7  |
|       |       |     | Reverse | TGAAGTGAAGGTGCAGTCGT           | 20 | 59,47 | 50    | 2,7  |
|       | 7     | 159 | Forward | GCCTGACATCTGGAATGCTC           | 20 | 60,78 | 55    | 1,6  |
|       |       |     | Reverse | CCGGTTCCATGAAAACAAAC           | 20 | 60,21 | 45    | 2,5  |
|       | 8     | 230 | Forward | GTGATGTGCTTCATTTTCATCC         | 22 | 59,44 | 40,91 | 1,0  |
|       |       |     | Reverse | AATTGTTTGGCAGGTTGGT            | 20 | 59,34 | 40    | 1,4  |
|       | 9     | 200 | Forward | GCACCTCTGCCTTCCACTT            | 19 | 60,40 | 57,89 | 1,3  |
|       |       |     | Reverse | TGGAGATTAGGGAGCAAGGA           | 20 | 59,77 | 50    | 2,8  |
| TTN   | 14*   | 109 | Forward | ACGTTGGATGATGCTCAGCAGACCACTTTG | 30 | -     | -     | -    |
|       |       |     | Reverse | ACGTTGGATGTTCTGAGGCTGGACGTTGG  | 30 | -     | -     | -    |

\* Primers construídos não exclusivamente para reacções de HRM.

Int – Intrão; %GC – percentagem de Guanina e Citosina; ΔG – Energia livre de Gibbs; n.p. – Sem estrutura possível

**Anexo II – Artigo: *Genetic Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy using Mass Spectrometry DNA Arrays and High Resolution Melting.***

**DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE MIOCARDIOPATIA HIPERTRÓFICA POR RECURSO A ESPECTROMETRIA DE MASSA COM ARRAYS DE ADN E DESNATURAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO**

**GENETIC DIAGNOSTIC OF HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY USING MASS SPECTROMETRY DNA ARRAYS AND HIGH RESOLUTION MELTING**

**Santos S., PhD <sup>(1, 2,5)</sup> \*, Lança V., PhD <sup>(1)</sup> \*, Oliveira H., BSC <sup>(1)</sup>, Silveira L., BSC <sup>(1)</sup>, Marques V., BSC <sup>(1)</sup>, Brito D., MD, PhD, <sup>(3)</sup>, Madeira H., MD, PhD, <sup>(3)</sup>, Bicho M., MD, PhD, <sup>(1)</sup>, Fernandes A.R., PhD <sup>(1, 4, 5)</sup>**

\*These authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Centro de Metabolismo e Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal

<sup>3</sup>Centro de Cardiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Portugal

<sup>4</sup>Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

<sup>5</sup>Centro de Química Estrutural, Instituto Superior técnico, Portugal

Corresponding author: Alexandra R. Fernandes: Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; [alexandrancrfernandes@gmail.com](mailto:alexandrancrfernandes@gmail.com); TM: 968078993

**Resumo**

A Miocardiopatia Hipertrófica (MH), uma doença genética complexa do miocárdio com um padrão de transmissão autossómica dominante e prevalência de 1:500, é a forma mais frequente de morte súbita em jovens aparentemente saudáveis. Os benefícios de um diagnóstico baseado nos genes associados a MH, adequado à investigação básica e à prática clínica, estão, no entanto, limitados pelos consideráveis custos das estratégias actuais de diagnóstico genético, baseadas em sequenciação automática, devido ao elevado número de genes e mutações envolvidas nesta doença. Todavia, consideramos que a conjugação de duas técnicas de elevada resolução – Genotipagem por Espectrometria de Massa (GEM) e Desnaturação de Alta Resolução (DAR) – tem demonstrado ser uma estratégia encorajante para o diagnóstico de MH. Foi nosso objectivo avaliar a eficácia diagnóstica destas duas técnicas no âmbito desta patologia, estudando 13 indivíduos com fenótipo de MH. Neste sentido, foram colhidas amostras de sangue periférico de: (i) sete indivíduos clinicamente diagnosticados com MH, todos com mutações previamente identificadas por sequenciação automática, e actuando como amostras *blinded* (“amostra tipo 1”); (ii) um indivíduo clinicamente diagnosticado com MH sem mutações identificadas após sequenciação dos 5 principais genes associados a MH, *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2* e *MYL2* (“amostra tipo 2”); e (iii) cinco indivíduos clinicamente diagnosticados com MH sem estudo genético prévio (“amostra tipo

3”). As 13 amostras foram analisadas por GEM para 534 mutações conhecidas em 32 genes associados a um fenótipo de MH e para todas as regiões codificantes e fronteiras exão/intrão dos mesmos genes por DAR. Estes 32 genes estudados incluem os 5 genes mais frequentemente associados a MH e outros 27 genes reportados como associados a MH numa menor frequência. Esta estratégia permitiu-nos identificar uma mutação c.128delC (p. A43Vfs165) que origina uma alteração na grelha de leitura da proteína codificada pelo gene *CSRP3*, um gene usualmente não analisado pela estratégia corrente de diagnóstico genético. Esta mutação em heterozigotia no gene *CSRP3* foi encontrada em dois doentes (amostra tipo 2 e 3) com 50 e 52 anos respectivamente, e que apresentavam hipertrofia ventricular esquerda difusa. Esta estratégia permitiu-nos ainda identificar uma nova alteração c. C>T817 (p.Arg273Cys) no gene *MYBPC3* num indivíduo da amostra tipo 3 que foi posteriormente confirmada por sequenciação. Esta nova alteração no gene *MYBPC3*, ausente em 200 cromossomas de indivíduos saudáveis, afecta um codão cuja mutação foi já associada a MH – p.Arg253His. Em conclusão, a conjugação de duas tecnologias, GEM e DAR, de elevada sensibilidade e baixo nível de resultados falsos positivos permitiu, na amostragem utilizada neste trabalho, uma genotipagem rápida, inovadora e de baixo custo em doentes com MH, podendo vir a tornar-se a curto prazo numa metodologia apropriada para o diagnóstico genético de MH.

**Palavras-Chave:** Miocardiopatia hipertrófica; Diagnóstico genético; Espectrometria de Massa por Arrays; Desnaturação de Alta Resolução; Proteínas sarcoméricas; gene *CSRP3*; Proteínas do disco Z.

## Abstract

Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM), a complex myocardial disorder with an autosomal dominant genetic pattern and prevalence of 1:500, is the most frequent cause of sudden death in young people apparently healthy. The benefits of a HCM gene-based diagnosis for both basic research and clinical medicine are limited by the high considerable costs of current genetic testing strategy due to the elevated number of genes and mutations involved in this pathology. However, we consider that coupling two high-throughput techniques - Mass Spectrometry Genotyping (MSG) and High Resolution Melting (HRM) – has demonstrated to be an encouraging new strategy for HCM diagnosis. Our aim was to evaluate the diagnostic efficacy of both techniques in this pathology by studying 13 individuals with clinical phenotype of HCM. Peripheral blood samples were collected from: (i) seven HCM clinically affected subjects, all bearing known-mutations previously identified by dideoxy-sequencing and thus being used as blinded samples (“sample type 1”); (ii) one HCM clinically affected individual negative for mutations after dideoxy-sequencing of the five more common HCM-genes, *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2* and *MYL2* (“sample type 2”); and (iii) five HCM clinically affected individuals not previously genetically studied (“sample type 3”). The 13 samples were analyzed by MSG for 534 known-mutations in 32 HCM phenotype associated genes and for all coding regions and exon/intron boundaries of the same HCM genes through HRM. The 32 studied genes include the most frequent HCM-associated sarcomere genes, as well as 27 genes with lower reported HCM phenotype association. This genotyping coupled strategy allowed us to identify a c.128delC (p. A43Vfs165) frame shift mutation in *CSRP3* gene, a gene not usually studied in current HCM genetic. The heterozygous *CSRP3* mutation was found in two patients (sample 2 and 3) with 50-year- and 52- year old respectively, both with diffuse left ventricle hypertrophy. Furthermore this couple strategy allowed us to find a novel mutation c. C>T817(p.Arg273Cys) in *MYBPC3* in an individual from sample type 3, posteriorly confirmed by dideoxy-sequencing. This novel mutation in *MYBPC3*, not present in 200

chromosomes from 200 healthy individuals affects a codon known to harbour a HCM-causing mutation – p.Arg253His. In conclusion coupling two technologies, MSG and HRM, with high sensitive and low false positive results, allowed in the cohort used in this work, a rapid, innovative and low cost genotyping of HCM patients, which can in a short return, be a cost-effective gene-based diagnosis appropriate for an accurate HCM genetic diagnosis.

**Keywords:** Hypertrophic cardiomyopathy; Gene-based diagnosis; Array-based Mass spectrometry; High Resolution Melting; Sarcomere proteins; *CSRP3* gene; Z-disc proteins.

## Introduction

Cardiomyopathies are associated with myocardial dysfunction which varies from an asymptomatic course to heart failure (HF) [1, 2, 3]. Hypertrophic cardiomyopathy (HCM), an autosomal dominant genetic disease which may afflict as many as 1 in 500 subjects and an important risk factor of sudden death (SD) or HF disability at any age, is characterized by a hypertrophied, non-dilated left ventricle (LV), myocyte disarray and interstitial fibrosis [4]. HCM is the most frequent cause for SD in young people otherwise healthy. In fact, its occurrence may be the only clinical manifestation of the disease. Genetic diagnosis is important in all patients with suspected HCM for several reasons: advising professional and/or leisure activity (namely in young people with familial history or familial SD); for genetic counseling (with the believe that certain mutations may be more dangerous than others); and, in general, to facilitate the genetic diagnosis in family members once a mutation has been identified in the index-patient [1, 2, 3]. Mutations in genes coding for myofilament contractile proteins (MP) of the cardiac sarcomere, e.g. *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* and *MYL2* represent the most common genetic subtype of HCM, with 30% to 65% prevalence in various cohort studies, thus been defined as a disease of the sarcomere (figure 1)[5]. Age dependency and absence of evident and unequivocal symptoms lead to a high probability of the knowledge of the condition being attained only after a sudden death (SD) event. Due to the high number of HCM-associated genes and the allelic heterogeneity of this disease, genetic screening techniques such as single strand conformational polymorphism (SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), denaturing high pressure liquid chromatography (dHPLC) are expensive and time-consuming. Automated dideoxy-Sequencing (AS) of the most frequent mutated HCM-genes (Table I - bold), the current “gold standard” genetic diagnosis test for HCM in Portugal, has low throughput, high cost (€350/gene) and poor sensitivity for detecting copy number variations (CNVs) or insertions/deletions (indels) and does not include genes that code for other proteins related to myocardium contraction such as the Z-band (figure 1). The Z band is critical for cyto-architecture and is involved in mechanosensory signalling of cardiomyocyte [7]. The Z band is composed by titin (*TTN*), teletonin (*TCAP*) and muscle Z protein (*CSRP3*). Remarkably, mutations in all of these genes have been found to cause HCM. **(Figure 1)**

The fact that in more than 1/3 of proband analysis no mutation is found [8] further hampers the cost effectiveness of the current genetic test, and underlines the need for the search of novel genes/mutations that enable a reliable genetic diagnosis. More than 646 HCM phenotype-associated mutations in 32 different genes (Table I), make full molecular testing by AS unbearably slow and expensive, prompting DNA microarrays has an alternative technique [9, 10, 11]. Our group is currently validating iPlex Mass Spectrometry (MSG), and High Resolution Melting (HRM) to improve HCM-gene based diagnosis. In contrast with AS genetic testing, high-throughput techniques, such as MSG genotyping and HRM scanning allow rapid and cost-effective testing for a large

number of different genes/mutations simultaneously. Genotyping by MSG involves multiplex primary PCR using outer primers that flank HCM mutation sites followed by a homogeneous mass extend (hME) reaction with multiple single inner primers that together generates fragments of different mass specific for each genotype (Iplex). To date, 534 mutations in 32 HCM-associated genes have been validated by our group (Table I) and a newly designed chip with 646 known mutations in 32 genes is being implemented. HRM is a high-throughput gene variation scanning technique that relies on the differential melting properties of sequences that vary in at least one nucleotide. For this reason it is used to identify novel mutations within samples. An advantage of MSG technique in comparison with other DNA microarrays techniques [10] is its capacity for detecting indels [10]. Nevertheless, MSG is ineffective for detecting novel mutations [11], making our coupled strategy using MSG and HRM methodologies most effective. MSG-HRM coupled strategy has overall costs of 50€ and 350€, respectively. We tested the validity of coupling both MSG and HRM due to its large potential for significantly increasing the throughput and speed of mutation detection, not to mention its promising value in association studies. This would apply either to already known or not yet known mutations in HCM patients or others, thus allowing analyzing genes rather specifically or at the same time randomly within a population or case study. Through this dual approach genes not previously studied by AS such as those coding for proteins of the Z-band will also be evaluated for mutations. The aim of this work was to develop new low-cost, accurate, gene-based diagnosis that will contribute to the understanding of the genetic basis of disease in specific populations. This approach has the potential to significantly increase our understanding about HCM development and recognition in and of itself a major support in the difficult clinical diagnosis of complex diseases.

## Population and Methods

Peripheral blood was collected from 13 Caucasian patients (Portuguese) with a diagnosis of familial HCM, and from 100 healthy subjects (controls). Diagnosis was established on clinical, electrocardiographic (ECG) and Ecocardiographic (ECHO) grounds. ECG/ECHO criteria have been previously discussed and published elsewhere [13]. Blood samples from HCM patients were divided in three groups: (i) seven blinded samples from patients with known-mutations (detected previously by AS of the five most common HCM-genes (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* and *MYL2*) in a reference genetic diagnostic laboratory of reference [12], (ii) a sample negative for mutations in the above HCM-genes; and (iii) five samples not previously studied. This study was approved by the Ethics Committee of the Faculdade de Medicina de Lisboa and all patients have signed an informed consent for genetic analysis. DNA was extracted from the blood samples using a Blood DNA kit (Roche Diagnostics). All DNA samples were analysed for 534 HCM-causing mutations (Human Genome Mutation Database <http://www.hgmd.org>; and Harvard Sarcomere mutation Database <http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/>) in 32 HCM-genes (Table I). Genotyping was performed using the IPLEX *MassARRAY matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF)* method (Sequenom GmbH, Germany). MSG system, based on the single base extension of an extend primer into the region of DNA variation, allows the detection of insertions, deletions, and single base substitutions in amplified DNA at multiplex levels of up to 36 DNA variants (Fig. 2). The extend primer is designed to hybridize adjacent to the variant being assayed and is extended by one of four mass-modified terminator molecules into the site of the nucleotide variation (mutation). The primer extension products are analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry and the genotypes differentiated on the basis on the mass of each allele (Fig. 2). All the 534 HCM-



causing mutations were submitted to MASSARRAY Assay Design 3.1 software. The design process produced 22 assay plexes. All polymerase chain reaction (PCR) and iPLEX reactions were performed under standard conditions [14] on a 384-well plate, allowing the analysis of 17 samples against the 22 assay plexes on the one plate. The multiplex PCR was carried out using Complete PCR Reagent Kit (3,840 reactions, Sequenom) in a 5 *ml* volume on a 7900 ABI PCR System (Applied Biosystems). Data analysis was done with Typer 3.4 and 4.0 software (Sequenom). (**Figure 2**)

Mutation scanning of all samples was performed using a high resolution melting (HRM) technique in a Real-Time PCR thermal cycler (LightCycler 480, Roche Diagnostics). The primers were constructed according to the common HRM specifications [<http://www.gene-quantification.de/LC480-Technical-Note-01-HRM.pdf>], using the following online software and databases: UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), DINAMelt (<http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/>), Poland service (<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>) and Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). The HPLC grade primers were purchased from Metabion (Germany). The amplification, melting and fluorescence detection conditions were as indicated by the supplier (Roche Diagnostics). Briefly, after amplification (35 cycles of 95°C for 10 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 10 seconds), the PCR products were heated to 95°C and cooled to 40°C (for heteroduplex formation), and melting was monitored (by fluorescence emission) from 65°C to 95°C. Table I list the exons/intron boundaries covered in the analysis (fragments include 100 bp 5' and 3' flanking intronic regions). Reference sequences of the genes were obtained from the Genome Browser of the University of California Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Results were analysed independently and when a mutation or a new variant was found, the PCR product was purified and sequenced (as a payed service, Stab Vida, Portugal). Whenever a mutation was confirmed in a proband, first and second degree relatives were tested for the identified variant in order to check the cosegregation with the disease in the family. Except for non sense and frame shift mutations, due to short insertions or deletions and splice site mutations, a missense variant was considered as a mutation when: - it cosegregates with the disease in the family; - affects an amino acid conserved among species and isoforms; and - it failed to be detected in at least 200 chromosomes of healthy adult controls. (**Table I**)

## Results

### Iplex Results

**Relative to sample type 1**, seven HCM-patients were initially sequenced for the five most important HCM-genes [12] and as result several mutations have been found in two genes, namely *MYBPC3* and *MYH7* as shown in Table II. Importantly, all these blinded mutations have been also detected by MSG technology (Table II). (**Table II**)

**In sample type 3** comprising the five HCM-patients not previously genetically studied, mutations were found by MSG in patients CMH016, CMH024, CMH030, CA02 (figures 3 and 4) (Table II). In **sample type 2** that includes the patient CMH012, negative by AS for mutations in the 5 most common HCM-genes, a mutation was detected by MSG (Table II; figures 3 and 4). In patient CMH004 we were only able to detect a polymorphism by MSG (Table II). Two samples from healthy individuals (with no HCM disease) were used as control in each MSG assay. (**Figure 3**) (**Figure 4**)

Finally, MSG analysis in patient CMH002 (**sample type 3**) was not able to identify any known HCM mutation.

### High resolution melting analysis

The CMH002 sample with no gene alteration detected by MSG, have been subject to a HRM covering 32 genes, those five main HCM-associated genes (bold in Table I) and those 27 other genes with low-association to disease (Table I). HRM primers were designed to prevent the formation of unspecific PCR products (primer dimmers, other fragments), fragment folding, and multiple melting domains. The performance of the primer pairs was verified by analysis of the melting temperature peak (1<sup>st</sup> derivative of the melting curve). The mutations scan was only done in fragments with a unique melting temperature peak. 100% of the tested primers were found adequate for mutation scanning. The same control samples used as negative samples for MSG were used for HRM. The detection of heteroduplexes was achieved by comparing the melting profiles, though difference plots (plots of differences between each point of the reference samples melting profile and the analyzed sample). If differences were judged as significant, in that they fell outside the accepted range of variation of the wild type samples, they were marked as variants. Fragments that included variations by this method were sequenced for confirmation. 4% were false positives. The test of fragments with known variants revealed no false negatives. HRM method allowed us to uncover a novel variation within exon 7 of the *MYBPC3* gene (NM\_000256) (Table III; figure 5A). **(Figure 5)**

Automated sequencing of this exon revealed the presence of a novel mutation c.C>T817/p.Arg273Cys in the *MYBPC3* gene in CMH002 patient (figure 5B). **(Figure 5)**

Despite the fact that this mutation is uncharacterised at the cellular level and has not been previously reported in the literature, we were unable to detect it in 200 chromosomes obtained from healthy control subjects (results not shown).

### Discussion and Conclusions

There are several genetic causes for left ventricular hypertrophy and a differential diagnosis is important because treatment options and prognosis may be different. Among these, HCM is the most frequent cause for SD in young people otherwise healthy. In fact, its occurrence may be the only clinical manifestation of the disease. Genetic diagnosis is important in all patients with suspected HCM for several reasons: advising professional and/or leisure activity (namely in young people with familial history or familial SD); for genetic counseling (with the believe that certain mutations may be more dangerous than others); and, in general, to facilitate the genetic diagnosis in family members once a mutation has been identified in the index-patient. In everyday practice, genetic diagnosis by standard procedures is difficult since they are technically complex, time consuming and expensive. MSG and HRM genotyping have demonstrated to be an encouraging strategy for HCM diagnosis allowing a low-cost, accurate and rapid diagnosis. In this study a novel mutation in *MYBPC3* gene was identified by combining MSG and HRM techniques. Using MSG analysis, we were also able to detect a known mutation c.128delC (p.Ala43Val/sX165) [7] in exon 3 of the *CSRP3* gene (NM\_003476) (figures 3 and 4), not detected by the current HCM-genetic diagnosis through AS of the 5 most common HCM-genes. Within the analysed group this mutation was detected in two samples from unrelated individuals (CMH012 and CA02) (figures 3 and 4) and its presence confirmed thereafter by AS (figure 4). CMH012 sample had been previously sequenced for *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* and *MYL2* mutations, with no relevant sequence alterations. Sample (CA02) had not been previously studied. Both patients (CMH012, female and CA02, male) presented

sub-aortic obstruction at rest and septal thickness (measured by ECHO) was 25 mm and 23 mm respectively. CMH012 patient was followed up during 6 years. Additionally, she had angina pectoris, heart failure due to ventricular diastolic dysfunction and syncopal events with no relation with effort or dysrhythmia, similarly to the symptoms of the male patient reported elsewhere [7]. The CMH012 patient died from heart failure at the age of 50, not long after testing. Her sister is also clinically affected (mild phenotype with discrete septal hypertrophy) while her daughter has no criteria (ECG/ECHO) for HCM. Despite our efforts we were not been able to genotype them yet. We have shown that MSG method allowed the detection of the c.128delC mutation in exon 3 of the *CSRP3* gene. The mutation was previously described as HCM-causing in a 53 y male, diagnosed at 46 years of age [7]. This patient was reported to suffer from angina pectoris and dyspnea, and also presented pre-syncope on follow-up [7]. Also AS of the main five sarcomeric genes had not revealed any HCM-causing mutation for this particular patient [7]. The c.128delC mutation generates a frame shift starting at the 43<sup>rd</sup> codon (out of 195 in the normal protein), therefore changing the structure of the muscle LIM protein. This changes conserved regions (figure 6A), including zinc fingers, which are considered important for the protein-protein interaction. These facts are consistent with the hypothesis that this mutation is the cause of HCM phenotype. **(Figure 6)**

In the case of sample CMH002 where no mutation was detected using MSG, we used HRM for mutation scanning in all 32 HCM-genes. This procedure allowed the detection of the c.C>T817/p.Arg273Cys mutation in the *MYBPC3* gene for this patient. To our knowledge, no report exists about this mutation causing HCM. The absence from the polymorphism databases ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org); [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) and from the 200 analysed chromosomes excludes this from being a common variant (results not shown). The conservation of this amino acid across mammals – figure 6B –, the difference between the properties of the amino acids changed (Arginin – polar, basic; Cystein – acid; apolar), and the reports of an HCM-causing mutation in the same codon [16], are all consistent with a disease causing mutation. Patient CMH002 (47 y) was first diagnosed with HCM at the age of 44 y in the course of an infectious endocarditis of the mitral valve. ECG was apparently normal but he had major ECHO criteria with a septal thickness of 27 mm. His brother had HCM diagnosed at 28 y and there has been 3 sudden deaths in their mother's family (ages < 50 y). Within this work we were able to detect all the blinded mutations in the tested samples and we were also able to detect a mutation c.128delC in exon 3 of *CSRP3* gene, a gene not currently analyzed through standard HCM-genetic testing, in two unrelated HCM patients, and a novel mutation, c.C>T817/p.Arg273Cys, in exon 7 of *MYBPC3* gene in other HCM patient. These mutations are the probable cause of these patient's HCM phenotype. Nevertheless, to further characterize the biological effect of these mutations in both genes, family members will be screened for those mutations (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> degree familiars presenting or not HCM symptoms) and functional studies using cardiomyocyte cultures harbouring those mutations are currently been performed. Taken together, all these results highlight the multiplex capacity of MSG based-array genotyping technique allowing the genotyping of 534 known mutations (in 32 genes) in at least 15 HCM-patients. Further emphasizes the HRM capability to rapidly scan the entire coding regions and intron/exon boundaries of the 32 HCM-associated genes to find new variations and probable disease causing mutations. MSG-HRM high throughput coupled technologies constitutes a strong candidate tool for a fast and precise diagnosis in multigenic diseases such as HCM. However MSG based-array genotyping technique is much less expensive and has much lower false positive results (1%) when compared with HRM,

making it a good promising technique when the mutation status of a population and the genes involved in the disease are fully known. In our work we intended to improve our gene-based diagnostic tools by using two new high throughput genotyping technologies. In this regard, understanding the genetic basis of HCM in the Portuguese population provides the opportunity for gene-based diagnosis [17]. The benefits of gene-based diagnosis of HCM for basic research and for clinical medicine are limited by the considerable costs of current genetic testing strategies and an incomplete knowledge of all disease genes. Recent genetic studies demonstrate variability in the types of HCM-mutations among different populations. For e.g, 4% of the Southeast Asian Indian population carries a common sarcomere protein gene mutation in *MYBPC3* that causes HCM and increases the risk for heart failure by >6 fold [18]. In the Netherlands, a single founding mutation also accounts for a substantial percentage of HCM, while in the US, there is marked genetic heterogeneity and most HCM-patients have a unique pathogenic mutation [17, 19]. The genetic basis for HCM in Portugal has not yet been extensively studied [1, 13, 20, our work]. Because most HCM-mutations were defined in many different populations (<http://www.hgmd.org>), its suitability for detecting HCM-mutations in Portuguese population is still unknown, even despite we were able to identify all the blinded mutations. In this regard, and due to the low number of samples analyzed in this work, we are currently genotyping more than 100 clinically characterized HCM patients from different regions of Portugal with an extended version of our MSG array that will be able to detect 646 mutations in those 32 HCM-associated genes. Moreover the number of known HCM mutations continued to expand; 250 HCM mutations have recently been found by our collaborators at the Harvard Medical School in US patients (C.E Seidman and J. Seidman personal communication). These mutations and the new mutation detected in this work will also be added to our MSG based array, so as to optimize detection of HCM mutations in Portuguese patients. In conclusion, our work allowed us to fulfill our initial objectives and prove the diagnostic efficacy of MSG and HRM techniques in this pathology by studying 13 HCM-patients. Indeed, we were able to detect all the blinded mutations in the tested samples, a mutation in a gene (*CSRP3*) not currently analyzed through standard HCM-genetic testing and a novel mutation in *MYBPC3* gene. The application of these methodologies to a cohort of more than 100 Portuguese HCM-patients is currently being performed by our group.

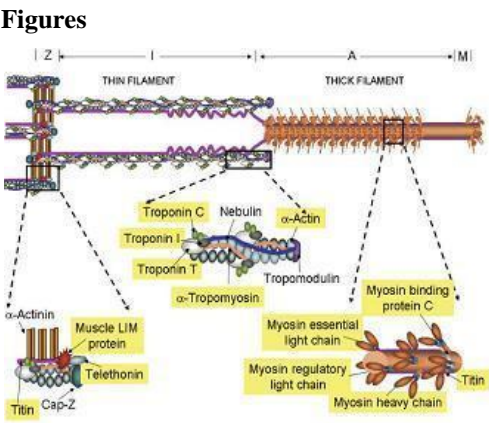
## Acknowledgements

The authors thank the collaboration of Carlos Pena-Gonçalves, Isabel Marques and João Costa, at the Instituto Gulbenkian da Ciência, Oeiras, Portugal, on the MassARRAY assays.

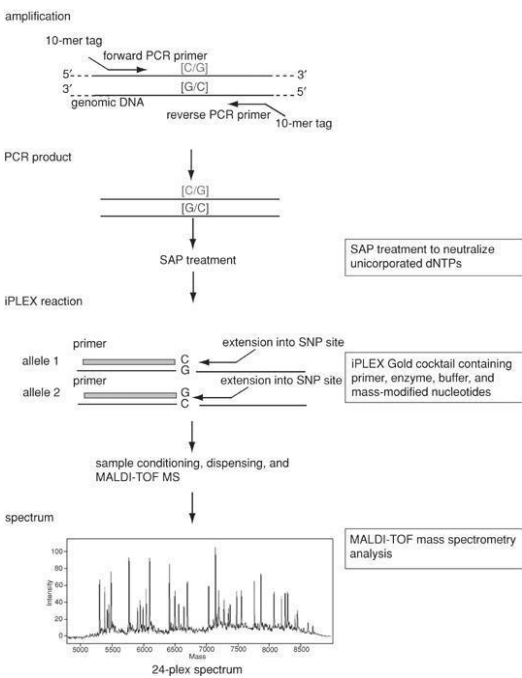
## References

- [1] Cardim N, Perrot A, Santos S, *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese population: mutations in the myosin-binding protein C gene. *Rev Port Cardiol* 2005; 24:1463-76.
- [2] Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2002; 11:2499–506.
- [3] Brito D, Richard P, Isnard R, Pipa J, Komajda M and Madeira H. Familial hypertrophic cardiomyopathy: the same mutation, different prognosis. Comparison of two families with a long follow-up. *Rev Port Cardiol* 2008; 22:1445-1461.

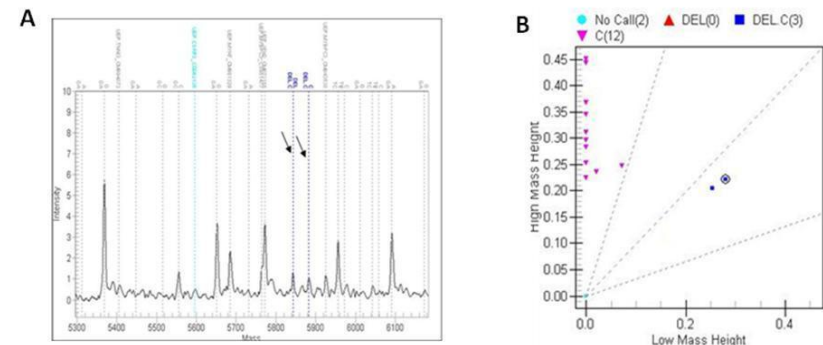
- [4] Maron BJ, Maron MS, Wigle ED and Braunwald E. The 50-year history, controversy, and clinical implications of left ventricular outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy: from idiopathic hypertrophic subaortic stenosis to hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:191–200.
- [5] Olivetto I, Girolami F, Ackerman MJ et al. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:630-638.
- [6] Andersen PS, Havndrup O, Hougs L et al. Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. *Hum Mut* 2009; 30:363–370.
- [7] Bos JM, Poley RN, Ny M, et al. Genotype phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin. *Mol Gen Metabol* 2006; 88:78-85.
- [8] Walsh RA. 2005. Molecular mechanisms of cardiac hypertrophy and failure. Florida: Taylor & Francis, 2005:1-736.
- [9] Waldmuller S, Freund P, Mauch S, Toder R and Vosberg HP. Low-density DNA microarrays are versatile tools to screen for known mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 2002; 19:560-569.
- [10] Fokstuen S, Lyle R, Munoz A, et al. DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 2008; 29:879-85.
- [11] Brion M, Allegue C, Monserrat L et al. Large scale analysis of HCM mutations in sudden cardiac death. *Forensic Science International: Genet Supp Series* 2008; 1:549-550.
- [12] Pascale R, Charron P, Carrier L, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of Disease Genes, Spectrum of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy. *Circulation* 2003; 107:2227-2232.
- [13] Brito D, Richard P, Komajda M, Madeira H. Familial and sporadic hypertrophic myopathy: differences and similarities in a genotyped population. A long follow-up study. *Rev Port Cardiol* 2008; 27:147-73.
- [14] Bansal A, van der Boom D, Kammerer S, et al. Association testing by DNA pooling: an effective initial screen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:16871–16874.
- [15] Stacey G, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP Genotyping Using the Sequenom MassARRAY iPLEX Platform. *Curr Protoc Hum Genet* 2009; 60:2.12.1-18.
- [16] Ingles J, Doolan A, Chiu C, et al. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counseling. *J Med Genet* 2005; 42:59.
- [17] Alcalai R., Seidman JG, and Seidman CE. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008; 19:104- 10.
- [18] Dhandapany PS, Sadayappan S , Xue Y et al., A common MYBPC3 (cardiac myosin binding protein C) variant associated with cardiomyopathies in South Asia. *Nat Genet* 2009; 41:187–191.
- [19] Alders M, Jongbloed R, Deelenc W et al. The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *Eur Heart J* 2003; 24:1848–1853.
- [20] Brito D. The enigmatic diversity of hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Port Cardiol* 2005; 24:1479-1484.



**Figure 1-** Sarcomere related structures [6].

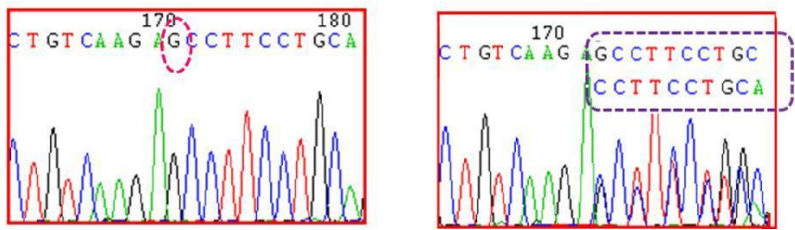


**Figure 2 -** The MassEXTEND iPLEX reaction. An illustration of the genotype reaction of a C-to-G SNP [15].

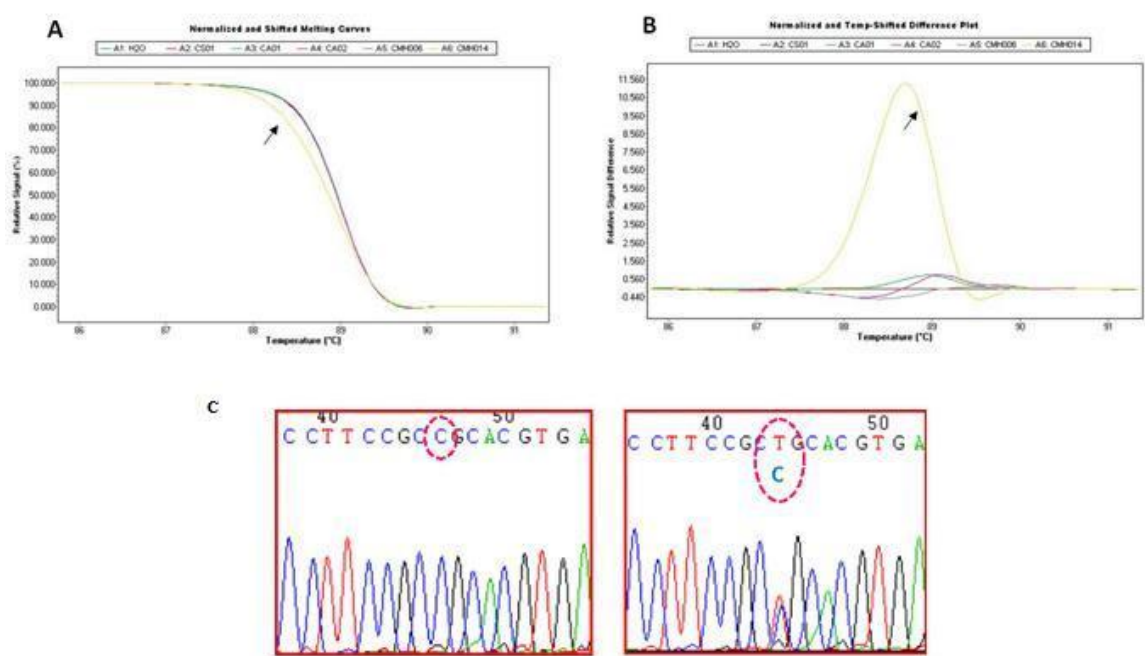


**Figure 3 – A.** Graphical representation of a MSG analysis illustrating the c.128delC mutation in the *CSRP3* gene. The presence of two peaks (arrows) indicates the mutation with a heterozygosity allelic pattern which the masses correspond to the “DEL” and “C” allele, respectively. **B.** Peak area plot corresponds to the “wild type”

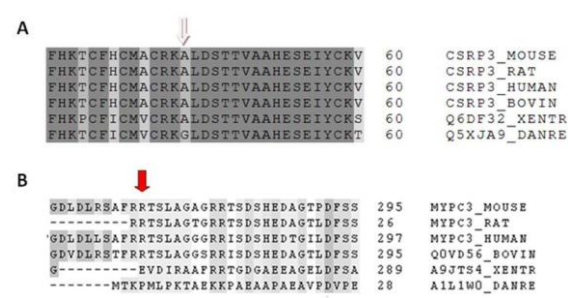
allele (C) *versus* the peak area of the mutated allele (DEL). The blue dots correspond to samples CMH012 and CA02, both heterozygotes for the c.128delC mutation in the *CSRP3* gene. Rose dots correspond to negative samples referring to the same mutation.



**Figure 4** - Chromatogram analysis resulting from sequencing exon 3 of the *CSRP3* gene in an healthy control (left),and CMH012 and CA02 patients (right).



**Figure 5** – **A.** Melting curves of exon 7 of the *MYBPC3* gene (NM\_000256). The arrow points out to the altered profile indicating a variation in sample CMH002. **B.** Difference plot of the melting curves. The arrow indicates a possible variation. Two healthy control individuals were used has a reference curve. **C.** Sequencing of exon 7 of the *MYBPC3* gene (NM\_000256). Left – healthy control, Right – HCM patient (CMH002).



**Figure 6** – **A.** Conservation across species of the region between 40<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> amino acid position of the muscle

LIM protein (source: <http://www.uniprot.org/>). The arrow points to the first amino acid changed by the *CSRP3* c.128delC mutation. [BOVIN – *Bos Taurus*; DANRE – *Danio rerio* (zebrafish); HUMAN – *Homo sapiens*; MOUSE – *Mus musculus*; RAT – *Rattus norvegicus*; XENTR - *Silurana tropicalis* (western clawed frog)]. **B.** Conservation across species of a region the myosin binding protein C (source: <http://www.uniprot.org/>). The arrow points to the first amino acid changed by the mutation [legend as in figure 6A.].

## Tables

**Table I** - Exons and exon/intron boundaries included in the HRM analysis. In bold are the five main HCM-associated genes. The number of HCM-associated mutations known\*\* and the ones analyzed in this work are also indicated.

\* obtained from UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)

\*\*Human Genome Mutation Database <http://www.hgmd.org>; and Harvard Sarcomere mutation Database <http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/>

| Gene          | OMIM          | Reference sequence * | Protein                                   | Exons Analyzed/ Total | Mutations Known** (analyzed in this paper) |
|---------------|---------------|----------------------|---|-----------------------|--|
| <b>MYBPC3</b> | <b>600958</b> | <b>NM_000256</b>     | <b>Cardiac myosin-binding protein C</b>   | <b>32/32</b>          | <b>241 (169)</b>                           |
| <b>MYH7</b>   | <b>160760</b> | <b>NM_000257</b>     | <b>β-cardiac myosin heavy chain</b>       | <b>40/40</b>          | <b>224 (224)</b>                           |
| <b>TNNT2</b>  | <b>191045</b> | <b>NM_000364</b>     | <b>Cardiac Troponin T</b>                 | <b>16/16</b>          | <b>37 (32)</b>                             |
| <b>TNNI3</b>  | <b>191044</b> | <b>NM_000363</b>     | <b>Cardiac Troponin I</b>                 | <b>8/8</b>            | <b>33 (26)</b>                             |
| <b>MYL2</b>   | <b>160781</b> | <b>NM_000432</b>     | <b>Regulatory myosin light chain</b>      | <b>6/7</b>            | <b>13 (10)</b>                             |
| <i>TPM1</i>   | 191010        | NM_0001018005        | α-Tropomyosin                             | 9/10                  | 11 (11)                                    |
| <i>ACTC1</i>  | 102540        | NM_005159            | Cardiac actin                             | 6/6                   | 12 (8)                                     |
| <i>MYL3</i>   | 160790        | NM_000258            | Essential myosin light chain              | 7/7                   | 5 (5)                                      |
| <i>CSRP3</i>  | 600824        | NM_003476            | Muscle LIM protein (MLP)                  | 6/6                   | 7 (7)                                      |
| <i>TCAP</i>   | 604488        | NM_003673            | Telethonin                                | 2/2                   | 5 (5)                                      |
| <i>TTN</i>    | 188840        | NM_133378            | Titin                                     | 2/45                  | 9 (2)                                      |
| <i>TNNC1</i>  | 191040        | NM_003280            | Troponin C                                | 6/6                   | 3 (1)                                      |
| <i>MYH6</i>   | 160710        | NM_002471            | α-myosin heavy chain                      | 13/39                 | 5 (2)                                      |
| <i>MTCYB</i>  | 516020        | AC_000021.2          | Cytochrome b of complex III               | 1/1                   | 2 (2)                                      |
| <i>MTTG</i>   | 590035        | AC_000021.2          | Mitochondrial RNA transfer, Glycine       | 1/1                   | 1 (1)                                      |
| <i>MTTI</i>   | 590045        | AC_000021.2          | Mitochondrial RNA transfer, Isoleucine    | 1/1                   | 1 (1)                                      |
| <i>OBSCN</i>  | 608616        | NM_052843            | Obscurin                                  | 1/52                  | 2 (1)                                      |
| <i>MYOZ2</i>  | 605602        | NM_016599            | Myozenin 2                                | 2/6                   | 2 (2)                                      |
| <i>MYLK2</i>  | 606566        | NM_033118            | Myosin Light Chain Kinase 2               | 1/12                  | 2 (2)                                      |
| <i>MYO6</i>   | 600970        | NM_004999            | Myosin VI                                 | 1/35                  | 1 (1)                                      |
| <i>DES</i>    | 125660        | NM_001927            | Desmin                                    | 1/9                   | 1 (1)                                      |
| <i>FXN</i>    | 606829        | NM_000144            | Frataxin                                  | 1/5                   | 1 (1)                                      |
| <i>PRKAG2</i> | 602743        | NM_016203            | 2 subunit of AMP-activated protein kinase | 2/12                  | 9 (7)                                      |
| <i>LAMP2</i>  | 309060        | NM_01399?            | Lysosome-associated membrane protein-2    | 1/9                   | 1 (1)                                      |



|                |        |           |  |      |       |
|----------------|--------|-----------|--|------|-------|
| <i>RAF1</i>    | 164760 | NM_002880 | V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 | 1/17 | 1 (1) |
| <i>CASQ2</i>   | 114251 | NM_001232 | Calsequestrin 2                                  | 1/11 | 1 (1) |
| <i>JPH2</i>    | 605267 | NM_020433 | Junctophilin 2                                   | 6/6  | 4 (4) |
| <i>VCL</i>     | 193065 | NM_014000 | Vinculin   | 1/7  | 1 (1) |
| <i>SLC25A4</i> | 103220 | NM_001151 | solute carrier family 25 member 4                | 1/4  | 1 (1) |
| <i>PLN</i>     | 172405 | NM_002887 | Phospholamban                                    | 1/2  | 5 (1) |
| <i>COX15</i>   | 603646 | NM_078476 | Cytochrome C oxidase assembly protein 15         | 1/9  | 4 (2) |
| <i>CAV3</i>    | 601253 | NM_033337 | Caveolin 3                                       | 2/2  | 1 (1) |

**Table II** – Patients, genes and mutations detected by MSG technology.

| Patient (sample type) | Gene (exon) | Mutation                            | Detection by MSG |
|-----------------------|-------------|-------------------------------------|------------------|
| CMH001 (1)            | MYBPC3 (25) | c. 2693G>A, p.V896M,                | Yes              |
| CMH003 (1)            | MYH7 (23)   | c.2770G>A, p.E924K                  | Yes              |
| CMH004                | MYH7 (32)   | c.4472C>G, p.Ser1491Cys (rs3729823) | Yes              |
| CMH005 (1)            | MYBPC3 (25) | C.2824C>T, p.R943ter                | Yes              |
| CMH006 (1)            | MYBPC3 (25) | C.2824C>T, p.R943ter                | Yes              |
| CMH013 (1)            | MYH7 (9)    | c.788T>C, p.I263T                   | Yes              |
| CMH014 (1)            | MYBPC3 (16) | c.1727G>A, p.W576ter                | Yes              |
| CMH035 (1)            | MYBPC3 (15) | c.1502G>A, p.R501Q                  | Yes              |
| CMH012 (2)            | CSRP3 (3)   | c.128delC, p. A43Vfs165             | Yes              |
| CMH016 (3)            | TNNT2 (15)  | c.833A>T; p.N278I                   | Yes              |
| CMH024 (3)            | MYH7 (9)    | c.788T>C; p.I263T                   | Yes              |
| CMH030 (3)            | MYBPC3 (15) | c. 1465G>A; p. R494Q                | Yes              |
| CA02 (3)              | CSRP3 (3)   | c.128delC, p. A43Vfs165             | Yes              |

**Table III** - Patient, gene and mutation detected by HRM.

| Patient (Group) | Gene (exon) | Mutation              | confirmation by sequencing |
|-----------------|-------------|-----------------------|----------------------------|
| CMH002 (3)      | MYBPC3 (7)  | c.817C>T, p.Arg273Cys | Yes                        |